UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1948 N° 114

Le dosage de la cholinestérase comme test de diagnose du sérum de cheval et de son état de conservation

THÈSE

POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

(Mention Pharmacie)

présentée et soutenue publiquement en Juin 1948

PAR

JEAN BROCA

Pharmacien

Diplômé d'Hydrologie

Jury { MM. VINCENT *Président*; BRUSTIER, CAUJOLLE, DELAS *Assesseurs.*; M. COUTURIER. *Suppléant* }

IMPRIMERIE FORESTIÉ
23, Rue de la République
MONTAUBAN

1948

LE DOSAGE DE LA CHOLINESTÉRASE COMME TEST DE DIAGNOSE DU SÉRUM DE CHEVAL ET DE SON ÉTAT DE CONSERVATION

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

TABLEAU DU PERSONNEL

	MM.
Doyen	CALVET.
Assesseur	LEFEBVRE.
Doyens honoraires	BARDIER. GORSE.

Professeurs honoraires

MM. RISPAIL, MOOG, MERIEL, CAUBET. RIBAUT, MAURIN, ARGAUD, DALOUS, LAFFORGUE, SERR.

PROFESSEURS

	MM.		MM.
Clinique de neurologie et psychiâtrie	RISER. TAPIE.	Clinique médicale infantile et puériculture	SOREL (R).
Clinique médicale	ROQUES.	Pharmacie	CAUJOLLE
Clinique obstétricale	GARIPUY.	Pathologie interne	MOREL.
Physiologie	SOULA.	Bactériologie — Hygiène — Médecine sociale	ANDRIEU.
Clinique chirurgicale et du cancer	DUCUING.	Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	N.
Physique biologique et médicale.	BUGNARD.	Clinique des maladies des voies urinaires	FABRE (P.)
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	NANTA.	Matière médicale	VINCENT.
Chimie et toxicologie	BRUSTIER.	Hydrologie thérapeutique et climatologie	MERIEL (P.)
Pathologie générale et médecine expérimentale	SENDRAIL.	Anatomie pathologique	FABRE (J.)
Clinique chirurgicale et gynécologique	LEFEBVRE. VALLOIS.	Clinique oto-rhino-laryngologique et maxillo-faciale	CALVET.
Anatomie	CLERMONT.	Clinique ophtalmologique	CALMETTES.
Histoire naturelle	DELAS.	Chimie biologique	N.
		Médecine légale et déontologie	PLANQUES.
		Histologie et embryologie	BROUSSY.

PROFESSEURS SANS CHAIRES

Physiologie	M. BAISSET.	Anatomie	COULOUMA.
Obstétrique	M. GUILHEM.		

AGRÉGÉS EN EXERCICE

	MM.		MM.
Anatomie	LAZORTHES	Chirurgie	VIRENQUE. GRIMOUD. RIEUNAU. DIEULAFE. DAMBRIN (P.).
Histologie	BIMES ch. de f		
	GADRAT.		
Médecine	DARNAUD. GERAUD. DARDENNE. LAPORTE (J.)	Ophtalmologie	DEODATI.
		Physique médicale	MARQUES.
		Chimie générale pharmaceutique.	BLANC.
		Chimie Médicale	VALDIGUIÉ.
		Histoire naturelle pharmaceutique	Mme Dulucq Mathou
		Odonto-Stomatologie	CADENAT.
		Pharmacie	COUTURIER

COURS COMPLÉMENTAIRES

	MM.		MM.
Cours d'obstétrique aux élèves sages-femmes	GARIPUY.	Clinique de la tuberculose	MOREL (L.). P. DAMBRIN.
Cours d'anat. physiol. et pathol. élém. aux élèves sages-femmes.	GUILHEM.	Parasitologie	LASSERRE.
Chimie pathologique	VALDIGUIE (P).	Botanique et cryptogamie	Mme Dulucq-Mathou
Chimie biologique	VALDIGUIE.	Chimie analytique	BLANC.
Chimie minérale	BLANC.	Hydrologie et géologie	ASTRE.
Physique pharmaceutique	AUVERGNAT.	Anatomie médico-chirurgicale	THOMAS.
Dermatologie et syphiligraphie	BAZEX.	Médecine Sociale et du Travail.	BONHOURE.
Législation pharmaceutique	BOUISSET.	Pharmacodynamie	BONHOURE.
Microbiologie	BOUISSET.	Bactériologie et Hygiène	LAPORTE.
		Urologie	LHEZ.
		Ophtalmologie	DEODATI.
		Neuro-chirurgie	LAZORTHES.
		Clinique O. R. L.	CLAUX.

Secrétaire de la Faculté ..... DUCROS

La Faculté déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats.
(Délibération du 12 Mai 1891).

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1948 N° 114

Le dosage de la cholinestérase comme test de diagnose du sérum de cheval et de son état de conservation

THÈSE

POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

(Mention Pharmacie)

présentée et soutenue publiquement en Juin 1948

PAR

JEAN BROCA

Pharmacien

Diplômé d'Hydrologie

Jury { MM. VINCENT *Président*; BRUSTIER, CAUJOLLE, DELAS } *Assesseurs.*; M. COUTURIER. *Suppléant*

IMPRIMERIE FORESTIÉ
23, Rue de la République
MONTAUBAN

1948

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

A MA FEMME

A MON PÈRE, A MA MÈRE,

A MON MAITRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE :

Monsieur le Professeur VINCENT

Professeur de Matière Médicale,

qui m'inspira cette étude, dirigea mes travaux et me prodigua ses conseils ; ce m'est un devoir bien doux de lui exprimes ma déférente et vive gratitude pour le bienveillant intérêt qu'il m'a toujours témoigné.

A MON JURY DE THÈSE :

Monsieur le Professeur BRUSTIER,

Monsieur le Professeur CAUJOLLE,

Monsieur le Professeur DELAS,

Monsieur le Professeur agrégé COUTURIER,

HOMMAGE RESPECTUEUX.

A TOUS MES MAITRES

A MES AMIS

A MES PARENTS

INTRODUCTION

Depuis environ vingt ans qu'a été démontrée l'existence de la cholinestérase, enzyme hydrolysant l'acétylcholine, d'innombrables travaux ont permis d'obtenir beaucoup de renseignements précis sur son comportement biochimique, sa spécifité, ses inhibiteurs et surtout son intérêt physiologique notamment en ce qui concerne la cholinestérase du système nerveux et neuromusculaire facteur capital dans les phénomènes de la médiation cholinergique.

L'étude de cet enzyme se révèle également intéressante par certains problèmes pratiques qu'elle permet de résoudre. Déjà, l'application clinique du dosage de la cholinestérase sérique bien qu'assez éloignée et, semble-t-il, indépendante de celle du système nerveux, rend des services en pratique courante, dans les insuffisances hépatiques, dans la tuberculose, etc... surtout comme test de la valeur de l'état général.

La cholinestérase du sérum peut être utilisée, d'autre part, comme intermédiaire spécifique pour détecter et pour titrer commodément certaines substances qui l'inhibent intensément. Tel est le cas du dosage biochimique de l'ésérine et de certaines applications toxicologiques établies par M. le Professeur VINCENT et ses élèves Mlle A. MAUGEIN et P. BEAUJARD.

Continuant la ligne de recherches déjà poursuivie par nos prédécesseurs dans le laboratoire de M. le Professeur VINCENT c'est encore d'applications pratiques que nous nous occuperons dans ce travail. Cette thèse de doctorat en pharmacie veut autant que possible s'attacher à des problèmes officinaux ou industriels d'ordre pratique concernant le sérum de cheval.

La titration de la cholinestérase du sérum ne peut-elle être un test commode pour l'essai du sérum de cheval ?

Ne peut-on obtenir par ce moyen simple une discrimination facile entre les divers sérums et, éventuellement, dépister des falsifications du sérum équin par ceux d'autres espèces de valeur marchande inférieure ? Nous verrons que l'on peut répondre par l'affirmative.

Enfin il apparait intéressant de voir dans quelle mesure les variations du titre des sérums en activité cholinestérasique peuvent être des indicateurs de leur ancienneté et de leur état de vieillissement et, du fait même, servir de base à la comparaison de leurs divers modes de conservation.

Ce sont ces problèmes pratiques qui retiendront ici notre attention et auxquels nous apporterons notre modeste contribution.

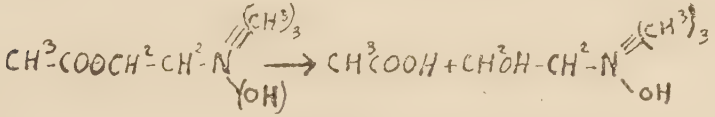
Première partie

Généralités sur la cholinestérase

Il n'est pas dans nos intentions de faire une étude complète de la cholinestérase, ce chapitre de l'enzymologie, bien que relativement récent, est suffisamment connu pour nous permettre de n'en rappeler ici que les grandes lignes.

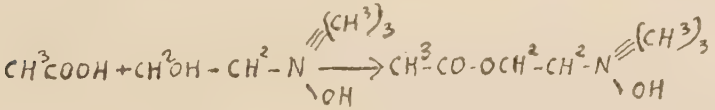
On sait que cet enzyme, dont l'existence fut pressentie par DALE en 1914 (11), a été découvert en 1926 par LŒWI et NAVRATIL (35).

Il intervient dans l'organisme en hydrolysant l'acétylcholine libérée au cours de la transmission de l'influx nerveux ;



la choline qui prend naissance est dix mille fois moins active que son dérivé acétylé.

On peut admettre qu'obéissant aux données classiques de la réversibilité des actions fermentaires de CROFT HILL et de BOURQUELOT de la cholinestérase, par un phénomène de retour inverse de la réaction d'hydrolyse, possèderait un pouvoir synthétisant de l'acétylcholine.



Toutefois d'après les données de NACHMANSOHN, la réaction de synthèse de l'acétylcholine paraît bien dévolue à un enzyme spécial appelé choline-acétylase.

Le développement des techniques de purification des enzymes d'une part, la mise en œuvre de nouvelles méthodes chimiques ou physico-chimiques d'investigation d'autre part, ont permis au cours de ces dix dernières années de préciser quelques points de la constitution de la cholinestérase.

COMPOSITION CHIMIQUE :

C'est ainsi que NACHMANSOHN et LEDERER (46) ont pu révéler la présence dans sa molécule de groupements SH et montrer leur importance fonctionnelle, MASSART et DUFAIT (39) celle d'un ion métallique qui serait l'ion calcium, capable de réactiver la cholinestérase après dialyse.

A la lumière des travaux effectués jusqu'ici, la cholinestérase apparait donc comme un sel de protéïde probablement calcique dont les groupements thiols assument un rôle important à son activité.

ORIGINE :

Comme on l'a fait pour bien d'autres diastases on a recherché quel était dans le corps humain le lieu de formation de la cholinestérase. De nombreuses observations permettent de supposer que la cholinestérase, comme la sérum-albumine dont elle est solidaire, a son origine dans le foie. Un équilibre enzyme/albumine relativement constant serait maintenu entre ces deux corps (M. FABER).

ROLE :

Le rôle de la cholinestérase est évidemment lié à celui de l'acétylcholine. Les travaux successifs de LŒWI (34), CHANG et GADDUM (10), DALE et FELDBERG prouvent que l'acétylcholine possède dans l'organisme un rôle tout à fait général de première importance, celui de médiateur chimique de l'influx nerveux.

Danielopolu (12) et Crivetz dans leurs recherches pharmacodynamiques plus récentes sur le rôle physiologique de l'acétylcholine lui attribuent un rôle vital de premier ordre. Ils constatent que d'une part la grande majorité des organes de l'économie sont excités par l'acétylcholine (tube digestif, bronches, voies urinaires et biliaires, musculature volontaire, glandes, etc...) ; de plus cette substance est libérée au niveau de tous les synapses, constituant l'excitant naturel des neurones et assurant la circulation de l'influx nerveux. D'autre part beaucoup de substances étrangères introduites dans l'économie libèrent de l'acétylcholine ou empêchent l'action de la cholinestérase ce qui d'une façon comme de l'autre aboutit au même effet.

Quel est en définitive le rôle de la cholinestérase ?

Il est logique d'admettre qu'elle est destinée à empêcher la diffusion des effets de l'acétylcholine libérée dans les extrémités nerveuses, l'hydrolyse par l'enzyme aboutissant à une inactivation.

La présence de la cholinestérase dans tous les organes, démontrée par les recherches d'Ammon, Stedman, Nachmansohn, Plattner et Hintner (51), etc... est en faveur de cette hypothèse.

Toutefois pour pouvoir admettre le rôle de la cholinestérase dans le phénomène de transmission chimique entre neurones ou entre le nerf et le muscle, il fallait démontrer que l'enzyme était capable d'hydrolyser la quantité d'acétylcholine libérée dans le temps très court de la période réfractaire entre deux influx. Or, Nachmansohn, Feldberg et Vartiainen se sont attachés à étudier quelle était la vitesse d'hydrolyse fermentaire de l'acétylcholine. Cette dernière serait de l'ordre de la milliseconde et serait compatible avec les données de la physiologie neuromusculaire, même si la fréquence des influx dans les synapses se trouvait être plusieurs fois supérieure à ce qu'elle est en réalité.

Cette théorie chimique de la transmission de l'influx nerveux ne peut cependant expliquer à elle seule tout le problème.

Lapicque (31), Bacq et Eccles font jouer un rôle à la transmission physique. L'influx nerveux serait assimilé à une vague de dépolarisation propagée des synapses jusqu'au récepteur. On admet aujourd'hui que pour stimuler la fibre musculaire le seul effet de l'excitation physique de la fibre nerveuse est incapable d'entraîner une réponse. Il semble, en réalité, que ces deux théories se complètent l'excitation physique de la fibre nerveuse déclencherait une réaction chimique auxiliaire capable de fournir le supplément de puissance nécessaire ; ce serait là le rôle de l'acétylcholine et de la cholinestérase.

Il faut remarquer que les données précédentes ne s'appliquent avec rigueur qu'en ce qui concerne le rôle de la cholinestérase du système nerveux. Celle du sérum s'en écarte par bien des points et parait assez indépendante de la première. D'une part Alles et Hawes, Richter et Croft, Mendel, Mundell et Rudney (1943) ont montré qu'elles n'ont pas les mêmes propriétés de spécificité, si bien que la cholinestérase du sérum non strictement spécifique des esters de la choline est nommée encore « pseudo-cholinestérase » en opposition avec la cholinestérase spécifique du système nerveux.

D'autre part les modifications pathologiques ou celles obtenues expérimentalement sous l'influence d'inhibiteurs tendent à prouver, de même que l'absence de cholinestérase dans le sérum de certains animaux, que la cholinestérase sérique est pratiquement sans rapport avec le fonctionnement nerveux et pourrait avoir un rôle métabolique beaucoup plus obscur (D. Vincent).

Méthodes de dosage de la cholinestérase

Des différentes techniques utilisées jusqu'à ce jour les unes sont d'ordre biologique les autres d'ordre chimique.

Méthodes biologiques :

Deux principes forment la base de toutes ces méthodes.

Les unes consistent à doser, après action du ferment pendant un temps donné et dans des conditions bien déterminées l'acétylcholine restante. Telles sont les méthodes de FUHNER (20) et MINZ (45) sur le muscle de sangsue ésériné, de CHANG et GADDUM (10), sur le muscle *rectus* ésériné de grenouille de D. VINCENT sur le muscle dorsal ésériné de sangsue, d'HEIM et FAHR (25) par mesure de la baisse de tension artérielle. D'autres mesurent la vitesse de cessation des effets de l'acétylcholine sur diverses préparations après addition de l'enzyme, HALPERN et CORTEGGIANI (23) utilisent le cœur isolé de l'escargot, GAUTRELET et SCHEINER le muscle *rectus abdominalis* de grenouille

Ces méthodes ne sont pas très sensiblees ni d'une grande précision aussi leur préfère-t-on les méthodes chimiques beaucoup plus simples, pratiques et régulières dans leurs résultats.

Méthodes chimiques :

Elles se basent toutes sur le même principe qui consiste à doser l'acide acétique libéré par hydrolyse de l'acétylcholine.

Cet acide acétique libéré peut se doser soit par alcalimétrie en présence de rouge de crésol ou de bleu de bromothymol soit par action de l'acide acétique sur du Ringer bicarbonaté et dosage manométrique du CO_2 libéré par l'appareil de Warburg.

Dans le premier cas il s'agit de méthodes alcalimétriques.

Le dosage se fait en titration continue à pH constant en ajoutant la solution titrée de soude continuellement de façon à saturer l'acide acétique formé au fur et à mesure de sa production (Stedman, Stedman et White (54), Hall et Lucas (24). On peut aussi faire la titration discontinue en opérant les affusions de soude seulement de 5 en 5 minutes pour ramener à son niveau de départ le pH qui a viré vers l'acidité (Vincent, Segonzac et Mlle de Prat) (65).

Des variantes de cette méthode ont été données par Pagel et Delhemmes (1947) ainsi que Morand et Laborit (1947).

Dans le second cas ce sont des méthodes manométriques (Ammon). Ces dernières sont plus précises mais plus délicates, que les précédentes qui ont cependant l'avantage d'être plus facilement applicables à la pratique courante clinique.

REPARTITION DE LA CHOLINESTERASE

En dehors des travaux dont nous avons parlé jusqu'à maintenant qui forment, si l'on peut dire, l'armature de base servant à authentifier et à identifier la cholinestérase nous devons également parler des recherches qui ont permis de l'étudier d'une façon plus détaillée. Certains travaux ont eu pour but de rechercher systématiquement la répartition de la cholinestérase. D'autres ont étudié l'action de produits chimiquement les plus divers, activateurs ou inhibiteurs de l'enzyme. D'autres enfin ont recherché les modifications pathologiques de la cholinestérase.

Dans le domaine bactériologique signalons les travaux effectués par D. Vincent et Mlle de Prat. Ces auteurs ont recherché l'existence de la cholinestérase chez quelques bactéries

et n'ont pu déceler qu'une action hydrolytique d'ailleurs très modérée et peu nette des cultures de certains microbes sur l'acétylcholine.

Chez les cryptogames aucune des nombreuses espèces étudiées par Oury et Bacq ne manifeste une activité cholinestérasique.

Parmi les animaux de nombreuses recherches ont été conduites chez les invertébrés dont certaines familles ont révélé un intérêt évident. Chez les mollusques, les Gastéropodes pulmonés et en particulier les Prosobranches ont une activité notable ; par contre les céphalopodes lamellibranches et les gastéropodes opistobranches ont une activité cholinestérasique très faible. (Vincent et Jullien (62), Bacq (5).

Chez les crustacés D. Vincent trouve une activité cholinestérasique très nette chez *Astacus* et *Palinurus* et Kochtojanz (30) chez *Daphnia* et *Cyclops*.

Chez les echinodermes l'activité cholinestérasique est du même ordre que chez les crustacés et les mollusques (Bacq et Nachmansohn).

Les vers et en particulier la sangsue possèdent une activité cholinestérasique très puissante que l'on inhibe par l'ésérine pour effectuer le dosage biologique de l'acétylcholine.

Les protozoaires et les cœlentérès ne semblent pas posséder de cholinestérase. Les Tuniciers en ont dans les muscles mais non dans le sang.

Chez les vertébrés, la cholinestérase semble exister dans tous les organes à des concentrations très variables. L'organe électrique de la Torpille (*Torpedo vulgaris*), possède une activité cholinestérasique extraordinaire liée à sa richesse en acétylcholine et certainement aux processus qui engendrent son pouvoir électrogène (Marnay et Nachmansohn).

La rétine est aussi un des tissus les plus actifs et on a pu montrer la présence de la cholinestérase surtout dans les zones de synapses. De même dans le système nerveux ; l'enzyme est électivement localisé dans la substance grise riche en cellules

(cortex, noyaux gris centraux) en opposition avec la substance blanche formée de conducteurs, d'activité cholinestérasique faible.

Dans le muscle la cholinestérase atteint une forte concentration dans les plaques motrices (Marnay et Nachmansohn). Le liquide céphalorachidien est pauvre en cholinestérase.

Le sang a fait l'objet de très nombreuses investigations.

Les hématies contiennent une cholinestérase fort active qui au point de vue biochimique se rapproche de celle des centres nerveux.

Le sérum nous retiendra surtout ici et c'est à la cholinestérase du sérum que nous consacrerons toute la suite de cet exposé.

LA CHOLINESTERASE DU SERUM

1°) *Caractères biochimiques de la cholinestérase.*

On sait actuellement, depuis les travaux d'Alles et Hawes (1940), Richter et Croft (1942) et surtout Mendel et Rudney qu'il faut distinguer plusieurs types de cholinestérases. En effet, diverses constatations expérimentales avaient montré que, selon qu'on s'adressait au sérum, aux globules ou à tel ou tel organe, l'hydrolyse de l'acétylcholine variait assez largement selon les cas. Ainsi le sérum agit plus intensément en présence de concentrations relativement fortes d'acétylcholine tandis que les globules sont plus actifs en présence de basses concentrations (Alles et Hawes).

L'étude de l'influence des inhibiteurs sur la marche de l'hydrolyse révèle aussi des observations fructueuses. Ainsi Zeller et Bisseger (68) (1943) ont remarqué par des recherches portant sur le sérum, les globules rouges et le cerveau que la cholinestérase du sérum est fortement inhibée par la Percaïne tandis que celle des globules ne l'est que faiblement. La caféine inhibe seulement la cholinestérase du sérum. La morphine les inhibe à peu près également.

D'autre part D. Vincent et Mlle Sero (58) à propos de recherches sur l'action inhibitrice de préparations de *Tabernanthe Iboga* ont signalé que l'inhibition observée varie très fortement selon l'organe utilisé comme source de cholinestérase et ils ont posé la question de la pluralité des cholinestérases.

Cette notion a été développée surtout par Mendel, Mundell et Rudney (1943) qui étudièrent avec beaucoup de soin la spécificité de la cholinestérase. Ils montrèrent que l'enzyme du sérum n'a qu'une spécificité fort imparfaite et hydrolyse aussi la tributyrine et le méthylbutyrate tandis que celui provenant des hématies et du cerveau est étroitement adapté aux esters choliniques. Aussi proposèrent-ils de nommer le premier « pseudocholinestérase » et le second « cholinestérase vraie ».

De leur côté Zeller et Bisseger désignèrent les deux types de cholinestérases : cholinestérase *s* (du sérum) et cholinestérase *e* (des erythrocytes). Récemment Augustinsson (1945) a étudié la cataphorèse de la cholinestérase du sérum et des globules rouges du cheval et il a pu constater des différences très nettes prouvant qu'il s'agit bien de deux enzymes distincts.

Voici un tableau montrant la répartition des deux types de cholinestérase dans le sang de diverses espèces (rapporté par Glasson, d'après Mendel, Mundell et Rudney).

		cholinestérase spécifique	pseudo-cholinestérase
Homme	globules	+ —	—
	sérum	—	+
Cheval	globules	+	—
	sérum	—	+
Bœuf	globules	+	—
	sérum	—	—
Chien	globules	+	—
	sérum	+ —	+
Chat	globules	+ —	—
	sérum	+	+
Lapin	globules	+	—
	sérum	+	+

On peut observer que dans les cas étudiés la « pseudocholinestérase » n'existe que dans le sérum, et qu'elle en est absente chez le bœuf. Par contre la cholinestérase vraie existe dans les globules de toutes les espèces examinées, mais on peut en trouver dans le sérum de quelqques espèces : le chien, le chat et le lapin.

Du point de vue de la spécificité vis-à-vis des esters cholini ques nous devons indiquer que, même la cholinestérase vraie peut hydrolyser d'autres ester que l'acétylcholine, par exemple l'acétyl-β, méthyl choline que n'atteint pas la « pseudo cholinestérase » du sérum. Inversement la benzoylcholine hydrolysée par la cholinestérase sérique ne l'est pas en présence de cholinestérase vraie.

Aussi peut-on déterminer par l'action sur ces divers substrats à quel enzyme on a affaire. NACHMANSOHN et ROTHENBERG (1945) ont établi ainsi que la phénylacétylcholine n'est hydrolysée que par la pseudocholinestérase, alors qu'elle ne l'est pas par la cholinestérase spécifique. Récemment A. DENYS et J. LÉVY (1947) ont proposé une méthode de dosage de la pseudocholinestérase sérique en présence de cholinestérase vraie spécifique en mesurant la vitesse de décontraction du muscle *rectus* de grenouille, contracturé par la benzoylcholine, ester que n'hydrolyse pas la cholinestérase vraie.

Voici pour nous résumer, quelques caractères différentiels schématiques, des deux groupes de cholinestérases.

Action sur :	Cholinestérase vraie spécifique type **e** globules rouges, cerveau	Cholinestérase non spécifique (pseudocholinestérase) type **s** sérum, pancréas
Acétylcholine	+	+
Acétyl B méthylcholine	+	—
Benzoylcholine	—	+
Tributyrine et méthylbutyrate	—	+
Concentration optimum de substrat (acétylline)	0,0006 M	0,06 M
Action inhibitrice de la percaine	+	

Faisons toutefois remarquer en terminant que cette division est schématique et ne donne que des caractères de groupe, susceptibles de varier encore selon l'origine de la cholinestérase étudiée, car les cholinestérases forment un groupe d'enzyme considérable qui au caractère commun d'hydrolyser électivement l'acétylcholine ajoutent des qualités particulières qui permettent de les différencier.

2°) *Répartition de la cholinestérase du sérum dans les diverses espèces animales.*

Dès 1898 Hanriot dans des études portant sur 9 espèces animales et Seller sur les poissons, crustacés, gastéropodes, céphalopodes, vers, démontrent l'existence d'estérases dans les liquides sanguins.

Plus tard les recherches de Lœwi, Lœwi et Navratil, Witanowski, Engelhardt et Lœwi, Ammon, conduisirent à la notion de la présence dans le sang et les tissus d'un enzyme spécifiquement adapté à l'hydrolyse de l'acétylcholine. Stedman appela ce ferment cholinestérase.

Nous avons vu plus haut que sa spécifité n'est pas absolue et que certains lui ont donné le nom de « pseudocholinestérase » par opposition à la cholinestérase vraie qui est celle des hématies et des systèmes neuromusculaires.

Stedman et White (54) étudièrent l'activité du sérum de 22 espèces différentes sur divers esters, mais avec des méthodes différentes.

L'hydrolyse des esters de la choline était suivie à 30° à pH = 8 par titration alcalimétrique continue durant 20 minutes ; celle de la tributyrine à 20° ; pH = 7,9 en 40 minutes par stalagmométrie.

Ces diverses méthodes rendent difficiles toute comparaison précise.

	Cm3 de NaOH 0,05 M utilisés en 20' avec			Diminution du nombre de gouttes (tributyrine)
	Butyryl-choline	[illegible] de Nage	Méthyl-butyrate	
Singe	8,8	3,45	0,15	13
Homme . .	4,95	2,6	0,15	10
Chien	4,8	2,45	0,15	4
Cheval . ..	5,15	2	2,95	21
Cobaye . ..	3,75	1,35	4,7	72
Chat	2,15		0,55	36
Pigeon ..	0,30		16,6	80
Oie	0		3,65	14
Canard . ..	0,20		2,85	21
Tortue . ..	0		1,95	
Souris	0,40		1,75	95
Porc	0,60		0	0
Poulet	0,50		0,25	4
Rat	0,05		1,05	18
Lapin	0,10		0,25	23
Bœuf	0,05		0,05	0
Mouton . ..	0,10		0,05	0
Furet	0		0,05	11
Grenouille .	0		0	0
Hérisson . .	0		0	0

A la lecture de ce tableau on peut constater qu'il y a de grandes variations dans l'activité de l'enzyme selon les espèces que l'on peut diviser en 3 groupes :

1er groupe (forte activité cholinestérasique) par activité décroissante : singe, cheval, homme, chien, cobaye, fox, chat.

2e groupe (faible activité cholinestérasique) : porc, poulet, souris, pigeon et canard.

3e groupe (pas d'activité cholinestérasique) : tortue, grenouille, hérisson, oie, rat, lapin, chèvre, bœuf, mouton, furet.

Nous donnons d'autre part ci-dessous un tableau de résultats obtenus sur le sérum de diverses espèces par Hall et Lucas. Dans leur méthode le pH = 7,2 et la température = 37,5.

L'activité est donnée en cm3 NaOH 0.01 M nécessaires en 40 minutes quand 0 cc. 5 de sérum est mis en présence de 10 cc. d'iodure d'acétylcholine à 0,01 M.

SUJET	Nombre de sujets étudiés	Activité cholinestérasique
Souris	20	de 8,6 à 13
Homme	12	de 3,38 à 7,18
Femme normale	8	de 3,04 à 7,24
Femme enceinte	5	de 2,70 à 5,58
Cobaye	17	de 2,50 à 4,60
Cheval	4	de 4,95 à 6,20
Chien	15	de 2,24 à 6,05
Chat	3	de 1,84 à 2,80
Poulet	11	de 0,56 à 1,56
Lapin	6	de 0,35 à 0,70
Porc	1	0,80
Bœuf	2	0,90
Mouton	4	0

Chez l'homme la valeur va de 2,70 à 7,24 chez 25 sujets normaux.

Le sérum de cheval a à peu près la même activité. Le sérum de chien est un peu plus bas. Le sérum de cobaye est assez actif. Le sérum de chat l'est beaucoup moins, de même celui de poulet. Les sérums de porc, bœuf et lapin sont très pauvres en enzyme et on n'a pû mettre en évidence aucune activité chez 4 moutons. On note ici une très forte activité pour le sérum de la souris, alors que Stedman et White (54) la notaient

comme faible. Sans doute la divergence vient-elle des différences dans les concentrations et la qualité du substrat employé (butyrylcholine et acétylcholine).

3°) *Modifications physiologiques et pathologiques.*

Ammon et Voss (2), Vahlquist, Jellineck and Looney (26), Abdon et Uvnas (1) se sont préoccupés de savoir si chez les sujets normaux l'activité cholinestérasique était constante d'un individu à l'autre, ils observèrent qu'elle subissait des variations considérables. L'activité cholinestérasique ne semble pas être modifiée nettement par le sexe. Il est à remarquer qu'elle est légèrement inférieure chez les nouveaux nés à ce qu'elle est chez l'adulte. Les processus physiologiques normaux ainsi que la grossesse n'ont pas d'après Mogens, Faber (18), d'influence marquée sur l'activité cholinestérasique. Toutefois d'après D. Vincent, Segonzac et Mme Petitmangin on note une tendance modérée à l'abaissement surtout vers le 3e mois, donnée confirmée par Piccoli et Longo (1947).

Etant donné le rôle prépondérant de la cholinestérase dans les prôcessus de médiation cholinergique non seulement dans le système nerveux autonome mais encore dans le système nerveux central et les synapses neuromusculaires il était logique d'attendre un corollaire clinique, riche d'applications pathogéniques et physiopathologiques. Ces espoirs furent, en grande partie déçus là où précisément, on les attendait le plus, c'est-à-dire dans l'étude des maladies nerveuses et neuromusculaires. Les premières tentatives furent faites en 1936 par Mc Kay et Hicks sur les myopathies, myasthénies où ils décelèrent une élévation de la cholinestérase ; des recherches ultérieures de Stedman et Russell, de Pichler trouvèrent au contraire une diminution ; en 1944 Wilson et Stoner la trouvèrent normale.

Dans la maladie de Parkinson, Yokoti observa un abaissement de la cholinestérase sérique qu'il rendit responsable de la rigidité musculaire, Pichler n'observa aucune modifi-

cation notable, enfin KASWIN constata une élévation. FROMENT et KASWIN (19) signalèrent pour les polynévrites une différence fondamentale dans le comportement de la cholinestérase du sérum suivant les formes cliniques ; augmentation d'activité dans les polynévrites éthyliques et arsénicales, taux normaux ou abaissement dans les polynévrites diphtériques et diabétiques.

D. VINCENT, G. SEGONZAC, Mlle de PRAT et P. BRYGOO (66) étudiant un cas de tétanos avec hypocalcémie intense et activité cholinestérasique fortement abaissée ont émis l'hypothèse, sous réserve de constatations plus nombreuses, que la perturbation de l'équilibre calcique entraînerait la diminution d'activité cholinestérasique et, que de ce fait, les crises de tétanie pourraient être reliées à la persistance anormale du médiateur aux plaques motrices. Abandonnons là l'énumération des quelques études faites jusqu'à ce jour sur les maladies nerveuses, les exemples cités font apparaître des résultats souvent contradictoires.

Dans les maladies hépatiques les résultats se révèlent beaucoup plus intéressants ,l'abaissement de l'activité cholinestérasique est un facteur de premier ordre pour leur diagnostic (ANTOPOL, 1937) et surtout leur pronostic. D. VINCENT et Mlle de PRAT (1942) ont étudié cet abaissement dans les cas d'insuffisance hépatique grave notamment dans les cirrhoses en décompensation et les ictères graves. FIESSINGER, GLOMAUD et CARLOTTI (1944) élargissant le champ de ces investigations utilisent ces données pour suivre l'évolution des cirrhoses. L'intérêt du dosage de la cholinestérase sérique dans l'insuffisance hépatique et les ictères a été confirmé par des recherches plus récentes de CRISTOL, PASSOUANT, BÉNÉZECH et Mlle DUTARTRE, de DELHEMMES, de Mlle JOURDAIN (1947).

Il est à signaler que chez les hépatiques graves on observe en général une intégrité à peu près parfaite du fonctionnement du système nerveux malgré un véritable effondrement de l'activité cholinestérasique du sérum.

SCOZ et CATTANEO (53) signalèrent une chute sensible de l'ac-

tivité cholinestérasique dans les cas de tuberculose grave et récemment D. Vincent et Malbec étudiant près de 150 cas ont vérifié l'intérêt du dosage de la cholinestérase dans l'évolution de la tuberculose pulmonaire.

Dans la syphilis D. Vincent et P. Brygoo (61) trouvent des chiffres au dessus de la normale, mais s'il y a des lésions hépatiques ils constatent un abaissement.

En dehors des cas précédents, on peut observer l'abaissement de la cholinestérase dans des cas d'anémies, de cancers cachectiques, certaines infections chroniques, dans l'urémie et dans les états de dénutrition sévère. Il y a par contre augmentation de l'activité cholinestérasique chez les hypertendus, les diabétiques et les hyperthyroïdiens (Antopol, M. Faber, Mc Ardle, Milhorat, Mlle de Prat, Cristol, Passouant, Bénézech, et Mlle Dutartre).

Notons enfin qu'on a signalé la chute cholinestérasique dans le schock anaphylactique et opératoire (Glasson, Frommel, Herschberg et Piquet), au cours de l'anesthésie générale (Herschberg, Geisendorff et Picquet), et récemment dans le mal de mer (Laborit et Morand).

Dans l'asthme les variations paraissent irrégulières mais Aron et Herschberg ont indiqué l'élévation de la cholinestérase dans les asthmes vrais. En ce qui concerne les dystonies neurovégétatives il ne semble pas que la mesure de la cholinestérase sérique puisse apporter des éléments de valeur déterminante comme on aurait été porté à le croire d'abord. Son intérêt réside plutôt dans sa valeur pronostique dans les insuffisances hépatiques et comme un test d'altération et de maintien général.

Quoi qu'il en soit, on a pu remarquer qu'une cholinestérase basse provoquée par les maladies citées précédemment, plus basse souvent que dans une intoxication ésérinée aigüe elle-même, ne s'accompagne pas obligatoirement de désordres caractéristiques dans le fonctionnement des systèmes nerveux et musculaires. Kaswin suppose que la cholinestérase du sérum même très diminuée dans son activité serait toujours ample-

ment suffisante en quantité pour inhiber instantanément les minimes quantités d'acétylcholine libérées sur les processus nerveux et musculaires.

Nous avons signalé déjà que B. Mendel et Rudney aboutirent à la conclusion qu'il y a au moins 2 enzymes susceptibles d'hydrolyser l'acétylcholine : d'une part une cholinestérase vraie qui agit exclusivement sur les esters de la choline, d'autre part une pseudocholinestérase qui peut agir sur des esters non choliniques.

Les deux variétés de cholinestérases sont donc différentes. On peut conclure que la cholinestérase du sérum n'est pas une cholinestérase vraie mais une pseudocholinestérase beaucoup plus sous la dépendance du foie que des éléments du tissu nerveux. Cette théorie expliquerait les résultats inconstants obtenus dans les maladies nerveuses et par contre du plus haut intérêt dans les maladies hépatiques lorsqu'on étudie leur retentissement sur la cholinestérase sérique.

Les inhibiteurs de la cholinestérase.

L'étude de l'action de diverses substances tant minérales qu'organiques sur l'activité cholinestérasique a fait l'objet de recherches systématiques. Au cours de nos travaux nous avons pû constater l'action inhibitrice de certains antiseptiques utilisés pour la conservation des sérums. Il nous semble utile de rappeler brièvement les travaux faits jusqu'ici sur les inhibiteurs de la cholinestérase.

En 1943 Ammon publia une étude fort détaillée des inhibiteurs de la cholinestérase. Il les classa en 6 groupes : les uréthanes, les bases ammonium ternaires et quaternaires, les amides et les amines, les réactifs du groupe thiol, les anions formant des précipités ou des complexes avec les ions métalliques et enfin dans un dernier groupe des produtis chimiquement les plus divers.

Dans ce rapide aperçu nous suivrons cette classification.

1°) *Les Uréthanes.*

Dans ce groupe l'ésérine, alcaloïde de la fève de Calabar est sans conteste l'inhibiteur le plus intéressant. Sa puissance inhibitrice sur la cholinestérase a servi de base à une méthode de dosage biochimique très sensible de cet alcaloïde (D. Vincent et A. Maugein (59), et à des applications servant à la détermination de l'activité de la fève de Calabar et des préparations officinales contenant de l'ésérine.

La génésérine a une action notablement plus faible (Kahane et Lévy (27) quatre à cinq fois moindre d'après D. Vincent et P. Beaujard (56).

Cette étude de l'ésérine amena certains auteurs à rechercher l'action de substances de synthèse dont la structure chimique possède certains points communs avec cet alcaloïde.

La Prostigmine (méthyl, sulfate du diméthyl, carbamate de m-oxyphényl, triméthyl, ammonium) présente des propriétés anticholinestérasique semblables à celles de l'ésérine. Elle a fait l'objet d'applications thérapeutiques dans le traitement de l'hypertension et Planques, Vincent, Dardenne et Mlle Toledo ont montré *qu'in vivo* chez l'homme elle augmente beaucoup les effets de l'acétylcholine.

Citons enfin la miotine qui, d'après Easson et Stedman (17), possède des propriétés identiques et le « métacompound » ou ester méthyl carbamique du m-hydroxyphényl triméthyl ammonium de Stedman dont l'effet est dix fois plus grand que l'ésérine elle-même, selon Schweitzer et Wright (52), Bacq et Brown (6).

2°) *Bases ammonium ternaires et quaternaires.*

La choline elle-même, ainsi que certains de ses esters se comportent à certaines concentrations comme des inhibiteurs de la cholinestérase, sans doute en se fixant sur l'enzyme de façon irreversible.

Le Doryl, ester carbamique de la choline aurait d'après Ammon une action inhibitrice particulièrement nette.

Certains colorants sont, d'après Massart et Dufait (39), des inhibiteurs puissants. Ainsi le bleu de méthylène pour une concentration de M/500.000 a encore une forte activité d'inhibition, tandis que sa leucobase ne possède aucun pouvoir antifermentaire. Le bleu Nil, la safranine, la bufoténine, la muscarine, ont des propriétés du même ordre.

Récemment Collier et Allen ont signalé l'influence inhibitrice des substances du groupe de la phénothiazine.

3°) *Amines, Amides et Alcaloïdes.*

Nombreux sont les alcaloïdes doués d'un pouvoir inhibiteur vis-à-vis de la cholinestérase du sérum, D. Vincent et P. Beaujard en ont donné un classement par ordre d'activité. Nous ne ferons que citer de nouveau l'ésérine et son génalcaloïde.

Dès 1926, Loewi et Navratil (35) ont aussi montré l'action anticholinestérasique des alcaloïdes de l'ergot.

La morphine et l'émétine (Kahane et Levy, Bernheim) (8) ainsi que les corps de leur série tels que l'apomorphine, la codéïne, la dionine, l'émétine, la papavérine, la narcotine ont un pouvoir inhibiteur relativement modéré paraîssant d'ailleurs lié à leur pouvoir émétique (Kahn et Surles) (29).

L'Ibogaïne (D. Vincent et I. Sero) (58), la pelletiérine, la cicutine, la colchicine, la quinidine (D. Vincent et P. Beaujard) (56), la spartéïne (Bernheim), la cocaïne (Ammon, Keeser), l'héroïne, la dihydrocodéïnone, la dihydroxycodéïnone (Dastugue) (13), la quinine et la nicotine (Matthes) (40), le curare (Harris), l'éphédrine et la caféïne (Kahane et Levy) (28), la strychnine (Nachmansohn) possèdent un pouvoir antiestérasique plus ou moins intense. D. Vincent et Mlle Mathou, Laurent (60) ont montré le fort pouvoir inhibiteur des alcaloïdes du Buis. L'étude de l'intensité de l'action anticholinestérasique des divers alcaloïdes vis-à-vis du sérum de che-

val a permis à D. Vincent et P. Beaujard (56) de mettre au point une méthode de recherche toxicologique surtout applicable à l'ésérine.

Les anesthésiques locaux synthétiques succédanés de la cocaïne, comme la novocaïne, la larocaïne, la pantocaïne ont tous un certain pouvoir inhibiteur dû au fait qu'ils sont, d'une façon générale, des amines ternaires auxquelles s'ajoute la structure de l'acide paraaminobenzoïque qui possèderait une action inhibitrice remarquable que Zeller a retrouvée dans les sulfamides. Cet auteur note une influence inhibitrice encore sensible du sulfamide pour une concentration moléculaire de 0,003. Cette inhibition est particulièrement élevée pour le sérum humain et va en progression décroissante pour les sérums de cheval, de bœuf et de cobaye.

Paget et Delhemmes ont confirmé récemment cette inhibition, d'ailleurs modérée, des sulfamides par la cholinestérase sérique. L'antagonisme acide paraaminobenzoïque-sulfamide n'a pas été retrouvé en ce qui concerne cette action antifermentaire.

Parmi les substances aminées et amidées citons encore l'action inhibitrice des antihistaminiques de synthèse (Antergan et Néoantergan) démontrée par Vincent et Brygoo qui ont aussi indiqué l'effet de certains dérivés organiques arsénicaux antisyphilitiques pentavalents, Atoxyl, Acétylarsan, Stovarsol, Tryparsamide, alors que le Novarsenobenzol est *in vitro* dépourvu d'action.

4°) *Les réactifs du groupe thiol.*

La cholinestérase ainsi que d'autres ferments possède un groupement thiol aussi a-t-elle son action nettement diminuée en présence des principaux réactifs de ce groupe ; le cuivre, l'acide monoiodacétique, l'acide maléïque et l'alloxane.

5°) *Anions formant précipités ou complexes avec les ions métalliques* Ba^{++} Ca^{++} Mn^{++} Mg^{++}.

Le fluorure de sodium, l'oxalate, le citrate, les arsénites et le pyrophosphate ont une action inhibitrice très nette (Massart et Dufait).

6°) *Autres substances.*

Dans ce groupe entrent les substances les plus disparates: des anions et des cations divers, autres que ceux déjà cités: arsénite (mais non arséniate) (Massart et Dufait, Vincent et Brygoo), nitrites (Vincent, Blanc et Beaujard), l'iode (Nachmansohn et Lederer), les iodures et bromures, l'aluminium, le bore et le zinc (Frommel, Herschberg et Piquet).

Les sels neutres tels que les chlorures de sodium et de potassium sont capables, selon la concentration, de modifier l'activité de l'enzyme par rapport à une concentration donnée de substrat et par le fait même, ils peuvent, dans certaines conditions se comporter comme des inhibiteurs ou des activateurs (Mendel et Rudney).

Sobotka et Antopol ont reconnu le pouvoir inhibiteur des acides cholique, glycocholique, désoxycholique sur la cholinestérase.

Les sels d'or utilisés en thérapeutique antituberculeuse sont d'après les recherches de Frommel, Herschberg et Piquet doués d'un effet inhibiteur considérable.

Dans leurs travaux sur les essences Caujolle, Vincent et Franck (9) ont trouvé un pouvoir inhibiteur intense pour des essences d'Aurantiées et surtout de Labiées.

Les toxines tétanique et diphtérique n'ont qu'une action faible sur la cholinestérase du sérum et seulement à forte concentration. D'après Vincent et Mlle de Prat ce n'est pas par ce mécanisme, semble-t-il, qu'elles manifestent leurs effets toxiques.

Récemment Mazur et Bodansky (1946) ont découvert un nouvel inhibiteur remarquable de D. F. P. (Diisopropyl fluorophosphate). Son effet sur la cholinestérase a la particularité d'être irreversible, si bien qu'après administration de ce toxique *in vivo* à l'animal l'inhibition cholinestérasique persiste de 5 à 10 jours, jusqu'à ce que l'organisme ait eu la possibilité de refaire la synthèse de l'enzyme. Il est remarquable de constater que dans ces cas l'inhibition de la cholinestérase sérique peut atteindre 100% sans provoquer la mort de l'animal, si bien que se trouve posé le problème de l'importance physiologique réelle de la cholinestérase du sérum.

Les Activateurs de la cholinestérase.

Certains cations divalents ont la propriété de réactiver la cholinestérase qui a été soumise à la dialyse: le calcium et plus accessoirement le magnésium et le manganèse. Le calcium serait l'activateur physiologique de la cholinestérase: Massart et Dufait (39), Mendel, Mundell et Strelitz (42). D'après Nachmansohn, le baryum serait aussi activateur alors que d'autres (Herschberg) le considèrent comme inhibiteur. Vincent et Malbec (63) ont observé chez l'homme, une certaine élévation du niveau de la cholinestérase sérique après injection intraveineuse de gluconate de calcium.

Parmi les activateurs citons encore les hyposulfites (Frommel, Herschberg et Piquet), le glutathion réduit (Nachmansohn et Lederer) certains acides aminés: lysine, arginine et surtout histidine (Aron, Herschberg et Frommel). La question de la vitamine C, acide ascorbique, considérée par Paschenko et Kraut comme activateur physiologique des estérases est encore controversée en ce qui concerne la cholinestérase dialysée. Frommel, Herschberg et Piquet l'ont vue capable de réactiver la cholinestérase sérique du cobaye diminuée sous l'influence des sels d'or ou du salvarsan, alors qu'elle est incapable de donner un effet activateur à la cholinestérase normale.

Enfin on a signalé que des hormones peuvent activer la cholinestérase : folliculine (Herschberg), testostérone (Wattenwyll, Bisseger, Maritz et Zeller, Herschberg). Mais ici les observations faites *in vitro* et *in vivo* ne sont pas concordantes. L'effet activateur *in vivo* semble indirect et ne se produit que par des réactions complexes de l'organisme.

Deuxième partie

Recherches personnelles

RESULTATS SUR LA VALEUR DE L'ACTIVITÉ CHOLINESTERASIQUE DU SERUM DANS LES DIVERSES ESPECES

Avant de faire l'étude approfondie de la cholinestérase du sérum de cheval et de son comportement en fonction du temps nous voulons tout d'abord apporter quelques résultats de dosages de la cholinestérase sérique chez un certain nombre d'espèces animales.

Nous nous sommes surtout adressé à des animaux domestiques.

Ce sont d'abord des animaux de boucherie dont le sérum pourrait éventuellement être utilisé comme falsification du sérum de cheval et dont il importe d'établir les caractéristiques biochimiques. Nous avons cru intéressant aussi d'y adjoindre des déterminations faites sur des animaux de basse-cour afin d'apporter seulement une modeste contribution à l'étude de la répartition de la cholinestérase sérique chez les animaux supérieurs : mammifères et oiseaux.

Nos résultats numériques sont donés en cm^3 de NaOH 0,01 M utilisés en 20 minutes, comme indiqué ci-dessous. (Voir les détails de la méthode, page 38).

Sérum de	Activité cholinestérasique
Cheval	4,4 à 5,8
Bœuf	0 à 0,2
Chien	3,3 2,3 et 4
Chat	0,80
Lapin	2,70
Cobaye	4,60
Dinde	4,80
Poule	2,90

A titre de comparaison indiquons que le sérum humain a une activité cholinestérasique allant de 4 à 6.

Nous voyons dans ces résultats que le sérum de cheval est pratiquement de même activité que le sérum de l'homme, alors que celui de bœuf est d'activité pratiquement nulle. La cholinestérase du sérum de chat parait beaucoup moins active que celle du sérum de chien, et celle de cobaye se situe à un niveau plus élevé que celle de lapin.

La poule et la dinde possèdent une activité cholinestérasique assez intense.

Dans l'ensemble nos résultats confirment ceux déjà apportés par STEDMAN et WHITE et par HALL et LUCAS que nous avons relevés plus haut. Toutefois une discordance importante se fait jour en ce qui concerne le sérum de lapin. HALL et LUCAS ne lui attribuent qu'une activité faible alors que de notre côté nous l'avons trouvée relativement intense quoique inférieure à celle des sérums de cobaye et de cheval. C'est une remarque inverse que l'on peut faire à propos du chiffre que nous donnons pour l'activité du sérum de chat.

METHODE DE DIAGNOSE DU SERUM DE CHEVAL

Nous allons exposer ici d'abord les détails de la technique de titration de la cholinestérase que nous avons employée, puis les applications mises au point pour le cas particulier de la diagnose de sérum de cheval.

1°) MÉTHODE DE DOSAGE DE L'ACTIVITÉ CHOLINESTÉRASIQUE.

Nous avons utilisé pour nos déterminations, une méthode alcalimétrique en titration discontinue, déjà employée par D. VINCENT et Mlle de PRAT, P. BEAUJARD.

On titre à l'aide d'une solution de NaOH l'acide acétique prenant naissance au cours de l'hydrolyse de l'acétylcholine en présence du sérum en laissant la réaction fermentaire s'opérer à température constante dans un thermostat à 38°. Le rouge de crésol sert d'indicateur.

A chaque addition de soude on ramène le pH à 8,0. Le dispositif utilisé permet de faire plusieurs dosages simultanément en vingt minutes par titration toutes les cinq minutes à la soude 0,01 M. Le volume de soude utilisée correspond à l'activité cholinestérasique du sérum étudié, déduction faite du volume de soude de même titre utilisé pour un essai témoin fait dans les mêmes conditions avec une solution d'acétylcholine seule, sans addition de sérum.

Appareils et réactifs nécessaires.

— Un thermostat électrique ou au gaz réglable à 38° avec dispositif permettant de maintenir dans l'eau des ballons qui doivent baigner jusqu'au col et de les retirer rapidement et facilement en cours de dosage pour les titrations successives à effectuer.

— Une série de burettes graduées au 1/20° de cm3.

— Une série d'éprouvettes graduées de 50 cm3, graduées en cm3.

— Une série de ballons contenant de 100 à 150 cm3.

— Des pipettes de 1 à 10 cm3.

— De l'eau distillée récemment bouillie conservée en flacons bouchés.

— Solution de rouge de crésol à 0,02% faite en dissolvant 0 gr. 10 de rouge de crésol Merck dans 5 cm3 de NaOH 0,05 M puis en diluant à 500 cm3 par de l'eau distillée.

— De la solution de chlorure d'acétylcholine à 2 pour mille (1). On peut aussi sans inconvénient utiliser les ampoules d' « Acécoline » commerciale en dissolvant le contenu d'une ampoule à 0,20 gr. dans 100 gr. d'eau distillée.

— Dans le cas qui nous intéresse les sérums que nous étudions devront être normalement exsudés, non hémolysés et, dans le cas de présence d'un dépôt, soigneusement agités, ce dernier possédant une certaine activité cholinestérasique comme nous le montrerons plus loin.

Mode opératoire.

Dans une éprouvette de 50 cm3 on mesure :

10 cm3 de solution d'acétylcholine à 2 pour mille ; X gouttes de solution de rouge de crésol.

On ajoute 20 cm3 d'eau distillée bouillie, on amène le mélange au pH 8,0 (coloration rose) par addition de NaOH 0,01 M et on complète à 49 cm3 par addition d'eau distillée bouillie.

Ce mélange est transvasé dans un ballon que l'on porte dans un thermostat de 38° et on laisse ainsi pendant 10 minutes.

On ajoute alors 1 cc. de sérum et on rajuste immédiatement au pH 8,0 avant de remettre à nouveau le ballon au thermostat.

On met alors la burette au zéro. Au bout de cinq minutes on retire le ballon dont le mélange a perdu la coloration rose. Une nouvelle affusion de NaOH 0,01 M le ramènera de nouveau au rose et ainsi de suite de cinq en cinq minutes jusqu'à la vingtième minute.

(1) Nous adressons nos remerciements à Monsieur le Directeur des Laboratoires Lematte et Boinot à Paris, qui nous a très obligeamment fourni l'acétylcholine nécessaire à nos essais.

L'activité cholinestérasique du sérum étudié est donnée par simple lecture de la burette, elle est égale à la somme des quatre affusions effectuées pendant les vingt minutes diminuée du volume de soude utilisé pour le témoin.

2°) Etude d'une méthode de diagnose du sérum de cheval basée sur la titration de la cholinestérase.

Dans les résultats exposés précédemment on est frappé de la différence de comportement des sérums de cheval et de bœuf en présence d'acétylcholine. L'un, celui de cheval, l'hydrolyse rapidement, l'autre, celui de bœuf, est pratiquement sans action sur elle. Il nous a semblé que l'on pourrait utiliser ce caractère facile à mettre en évidence dans un but de diagnose et d'essai du sérum de cheval. En effet, à notre connaissance aucune application de ce fait, pourtant déjà remarqué par Ammon, par Stedman et White ainsi que par Hall et Lucas, n'a encore été proposée.

De plus, il est certain que l'essai pharmaceutique du médicament qu'est le sérum de cheval n'est pas du domaine courant.

Peu de méthodes ont été proposées à cet effet pour le distinguer, par exemple, du sérum de bœuf. L'analyse avec dosage des principaux constituants de ces sérums : teneur en protides, lipides, cholestérol, détermination des concentrations respectives en sérumalbumine et en globulines comporte des opérations longues et délicates qui ne paraissent pas d'ailleurs apporter de données très catégoriques de différenciation.

Récemment (1944) Leulier et Revol ont indiqué que le dosage du soufre peut permettre certaines conclusions intéressantes. Sans doute existe-t-il aussi des méthodes physiques (réfractométrie, etc...) qui pourraient permettre d'établir des différences, mais il ne semble pas qu'elles aient été systématiquement étudiées et elles nécessiteraient un appareillage couteux et délicat.

Aussi est-il particulièrement intéressant de rechercher dans une différence massive de comportement fermentaire, en utili-

sant la titration de la cholinestérase, un critère simple permettant de distinguer le sérum de cheval de celui de bœuf qui, de valeur marchande bien moindre, pourrait éventuellement le falsifier.

A cet effet, on peut proposer plusieurs techniques. Sans parler de la méthode de titration manométrique de la cholinestérase avec l'appareil de Warburg qui ne peut être envisagée comme applicable à l'officine la méthode alcalimétrique que nous avons exposée précédemment, qui est relativement simple d'exécution, peut être utilisée. Toutefois elle nécessite dans son appareillage un thermostat à 38-40°, qu'on ne peut guère à la rigueur remplacer par une étuve à cause de la déperdition de chaleur provoquée par les sorties successives des ballons de 5 en 5 minutes nécessaires pour les titrations. A cause de cela nous avons aussi voulu essayer de faire la titration à la température ordinaire du laboratoire, afin d'éviter l'emploi d'un thermostat. Effectivement, bien que l'action enzymatique soit ralentie par rapport à la vitesse d'hydrolyse à 38°, la titration peut encore s'effectuer dans ces conditions et la différence des chiffres donnés par le sérum de cheval et celui de bœuf est encore très nette, surtout si l'on prolonge l'essai pendant 30 ou 60 minutes au lieu des 20 minutes du dosage normal.

Nous donnons ci-dessous les résultats obtenus, par comparaison d'échantillons de sérum de cheval et d'échantillons de sérum de bœuf, d'une part en utilisant un thermostat de 38° pour la réaction fermentaire (tableau I) et d'autre part en la laissant s'opérer à la température ordinaire (13 à 14°) (tableau II).

TABLEAU I

Volumes de NaOH 0,01 M utilisés pour l'hydrolyse de 10 cm3 de chlorure d'acétylcholine à 2 pour mille, à 38°, en présence de 1 cm3 de :

TEMPS	Sérum			Témoin (A.C. seule) (Hydrolyse spontanée)	Sérum			Témoin (A.C. seule)
	de bœuf	de bœuf	de cheval		de bœuf	de cheval	de cheval	
5 minutes	0,2	0,2	1,2	0,2	0,2	1,8	1,4	0,1
10 minutes	0,3	0,3	2,4	0,3	0,3	3,2	2,5	0,2
15 minutes	0,4	0,5	3,6	0,4	0,5	4,4	3,7	0,3
20 minutes	0,5	0,7	4,9	0,5	0,6	5,6	4,8	0,4
Valeur de l'activité cholinestérasique ...	0	0,2	4,4		0,2	5,2	4,4	

TABLEAU II

Volume ne NaOH 0,01 M utilisé pour saturer l'acidité produite par l'hydrolyse de 10 cm3 de chlorure d'acétylcholine à 2 pour mille, + 13-14° en présence de 1 cm3 de :

TEMPS	Sérum de		Témoin Acétylcholine seule (Hydrolise spontanée)
	Bœuf	Cheval	
5 minutes	0,1	0,6	0,1
10 minutes	0,2	1,3	0,2
15 minutes	0,4	2,2	0,3
20 minutes	0,4	3,0	0,3
25 minutes	0,5	3,6	0,4
30 minutes	0,6	4,1	0,4
40 minutes	0,7	4,9	0,5
50 minutes	0,8	5,7	0,5
60 minutes	0,9	6,4	0,6
Valeur de l'activité cholinestérasique (en 60 minutes)	0,3	5,8	

Ainsi on voit que, même sans l'emploi d'un thermostat, il est possible de distinguer facilement le sérum de cheval du sérum de bœuf.

Cependant il s'agit encore d'un dosage volumétrique nécessitant des additions de soude centinormale toutes les cinq minutes pendant un temps assez long. Ne peut-on pas simplifier encore la technique ? C'est ce que nous avons fait, en supprimant toutes les titrations volumétriques de façon à obtenir une méthode d'une extrême simplicité comme doit l'être une méthode officinale.

TECHNIQUE SIMPLIFIÉE « OFFICINALE » DE DIAGNOSE SÉRUM DE CHEVAL-SÉRUM DE BŒUF

Principe de la méthode.

L'hydrolyse de l'acétylcholine par le sérum se fait en présence d'une quantité connue et en excès de NaOH 0,01 M, très largement suffisante pour compenser l'hydrolyse spontanée de l'acétylcholine, mais insuffisante pour saturer l'acidité importante libérée par l'acétylcholine en présence du sérum de cheval. La réaction se fait en présence de rouge de crésol comme indicateur, lequel est rose à pH = 8 et au-dessus, et vire au jaune au-dessous.

Ainsi, après un temps donné, l'essai sérum de cheval a viré au jaune sous l'influence de l'acidification du milieu due à la libération d'acide acétique à partir de l'acétylcholine sous l'influence de la cholinestérase, tandis que celui contenant le sérum de bœuf est resté rose parcequ'il ne contient pratiquement pas de cholinestérase.

Appareils et réactifs nécessaires.

— Eprouvettes de 50 cm3.
— Pipettes de 1 et 2 cm3.
— Solution de rouge de crésol à 0,02%.
— Solution d'acétylcholine à 0,20%.

— Solution de NaOH à 0,01 M.

— Eau distillée récemment bouillie.

Mode opératoire.

Dans une éprouvette de 50 cm3, on mesure 10 cm3 de solution de chlorure d'acétylcholine à 2 pour 1.000 et X gouttes de solution de rouge de crésol à 0,02%, et on ajoute NaOH 0,01 M jusqu'à virage au rose (quelques gouttes seulement sont nécessaires). On complète alors à 49 cm3 avec de l'eau distillée bouillie, privée de CO_2. On ajoute 1 cm3 de sérum à essayer et, après avoir légèrement agité ,on amène à la coloration rose par quelques gouttes de NaOH 0,01 M, puis, immédiatement, on ajoute, en plus, 2 cm3 de cette même solution. On abandonne à la température du laboratoire pendant une heure, en notant de dix en dix minutes les modifications de teintes qui peuvent se produire. S'il s'agit du sérum de bœuf, la coloration rose persiste encore au bout d'une heure. S'il s'agit de sérum de cheval, le virage au jaune s'est fait au bout d'un quart d'heure environ. Il est bon d'adjoindre un essai fait avec la même quantité d'acétylcholine sous le même volume, mais sans sérum, qui permet de se rendre compte que l'hydrolyse spontanée de l'acétylcholine dans ces conditions ne suffit pas à acidifier le milieu durant le temps de l'expérience.

L'expérience ci-dessous rapportée permet de confirmer ces données. Elle a été faite avec, comme substrat, une solution obtenue avec le contenu d'une ampoule d' « Acécoline » commerciale que l'on peut utiliser sans inconvénient (ampoule de 0 gr. 20 de chlorure d'acétylcholine dissoute dans 100 cm3 d'eau distillée). Température = 18°.

Ainsi, au bout d'une heure, la teinte reste franchement rose dans le cas du sérum de bœuf tandis qu'elle a viré au jaune franc avec celui de cheval, même dans le cas de sérums anciens et dont le vieillissement a considérablement réduit l'activité. Notons toutefois qu'au bout d'un temps plus long, environ deux heures, la teinte finit par virer au jaune dans le cas du

sérum de bœuf comme d'ailleurs dans celui du témoin qui ne contient pas de sérum, cela sous le seul effet de l'hydrolyse spontanée de l'acétylcholine. Mais ceci laisse toujours une marge d'appréciation très largement suffisante pour la détermination du sérum de cheval, même s'il est d'activité considérablement diminuée.

Le tableau ci-dessous montre les modifications de colorations observées dans quelques essais.

Temps en minutes	SÉRUM de bœuf	de cheval (sérum conservé à la glacière)	de cheval (sérum datant de 1 mois et demi conservé à la t° du laboratoire	de cheval (sérum antiténa-nique vieux périmé en 1943)	de cheval (sérum anti-gangréneux - vieux périmé en 1942)	Témoin sans sérum (acétylcho-line seule)
	COLORATIONS OBSERVÉES					
0	rose intense	rose intense	rose intense	rose intense	rose intense	rose intense
10	rose intense	jaune rosé	rose faible	rose intense	rose	rose intense
20	rose intense	jaune	jaune	rose	jaune rosé	rose intense
30	rose intense	jaune	jaune	rose	jaune	rose intense
45	rose	jaune	jaune	jaune	jaune	rose
60	rose	jaune	jaune	jaune	jaune	rose

La technique simplifiée que nous préconisons, opérant à la température du laboratoire et sans titration d'aucune sorte, peut donc permettre la diagnose de ces sérums à l'officine par simple appréciation du virage au jaune du rouge de crésol en présence d'une quantité fixe de NaOH 0,01 M alors qu'au bout du même temps, l'essai du sérum de bœuf reste rose.

Nous pensons que cette méthode peut être utile comme technique d'essai de médicament pour le sérum de cheval, médicament inscrit au Codex de 1937.

ETUDE DES VARIATIONS DU TITRE EN CHOLINESTERASE DU SERUM DE CHEVAL EN FONCTION DU VIEILLISSEMENT ET DU MODE DE CONSERVATION

Le vieillissement entraîne des modifications notables dans l'équilibre physico-chimique du sérum et dans la répartition de ses divers constituants chimiques. On constate une augmentation de la conductibilité électrique, de la viscosité et une baisse de la tension superficielle du sérum (Buglia et Rolervanti, Leconte du Nouy).

Les études qui ont été faites sur ces processus ont porté surtout sur les changements apportés aux édifices moléculaires protéïdiques complexes, naturellement sensibles aux variations physico-chimiques du milieu. Mme A. Roche et Bracco (48) ont vu que le poids moléculaire de la globuline varie en fonction de la température et de la durée de conservation. Il diminue dans le sérum de cheval conservé plusieurs mois à 0° et il augmente si la conservation se fait à 37°. D'après Desbordes (15), le rapport sérum albumine/globuline s'abaisse progressivement lors de la conservation aseptique du sérum humain. On assiste, au fur et à mesure du vieillissement à une diminution de solubilité des protéïdes qui se manifeste, selon Roche, Olmer et Samuel (49), par une augmentation relative des globulines et une diminution des albumines. Des variations de poids moléculaires sont notées et un dépôt se fait progressivement.

A noter aussi que les quantités de lipides extractibles par l'éther à froid en présence de petites quantités d'alcool diminuent fortement (Delâge, d'après Desbordes) (14).

Il est certain que ces modifications protéïdiques en fonction du vieillissement ne sont pas sans retentir sur les diverses activités fermentaires du sérum.

Les ferments sont des systèmes biologiques relativement fragiles et instables et l'on sait que, pour certains tout au moins, leur activité diminue assez rapidement en quelques jours après le prélèvement. Ainsi pour prendre un exemple concret, il est classique d'insister pour que le dosage de la phosphatase alcaline du sérum, souvent demandé actuellement en biologie clinique, soit fait le jour même sous peine de voir l'enzyme diminuer rapidement d'activité.

Dans une note récente, Paget (47) indique à ce propos que la baisse d'activité phosphatasique du sérum est de 15 à 25% après 2 jours, de 30% en 4 jours et atteint 40 à 80% en 8 à 15 jours.

Le phénomène est presque identique si le sérum est conservé à la glacière mais il est beacuoup plus intense si le sérum est gardé à l'étuve à 37°.

La cholinestérase, qui appartient au même grand groupe d'enzymes comporte-t-elle un semblable caractère d'instabilité ? Il ne le semble pas. Des essais systématiques de titration de la cholinestérase de mêmes échantillons de sérums humains pendant un laps de temps allant jusqu'à dix jours après le prélèvement ont été faits par D. Vincent et P. Brygoo (64).

Aucune modification importante de l'activité cholinestérasique dépassant les limites d'erreur de la méthode, n'a été observée lorsque le sérum convenablement recueilli était conservé à la glacière sans autre précaution spéciale. Récemment Delhemmes reprenant la même question est arrivé à de semblables conclusions. La cholinestérase du sérum est donc un enzyme stable et en tout cas peu sensible aux modifications biochimiques qui accompagnent la « maturation » du sérum en dehors de l'organisme. Cependant il nous semble qu'aucune

recherche n'a été conduite à ce propos sur de longs espaces de temps de l'ordre de plusieurs mois et même de plusieurs années. C'est ce que nous avons voulu faire. Il est en effet intéressant et utile de savoir si l'activité cholinestérasique du sérum de cheval, bien que stable au début, décline progressivement ensuite au cours du vieillissement du sérum et dans quelle mesure, avec quelle vitesse se fait cette perte d'activité. Peut-être pourrait-on avoir là un test permettant de contrôler le vieillissement du sérum et éventuellement de dépister des fraudes sur l'âge d'un échantillon de sérum. Il est de même très probable que le mode de conservation du sérum a une influence considérable sur l'activité enzymatique, selon qu'on le garde à la glacière ou à la température ordinaire, selon qu'on l'a préalablement tyndallisé ou non ou enfin selon qu'on y a ajouté ou non un antiseptique. Nous avons voulu étudier ces diverses incidences de la question et nous en apportons ici les résultats.

Nous avons utilisé pour ces recherches plusieurs catégories de sérum de cheval. Dans tous les cas, la récolte a été faite aseptiquement et le sérum a été réparti en ampoules scellées permettant les meilleures conditions de conservation (1).

Chaque échantillon comportait un nombre suffisant d'ampoules de 5 cm3 pour permettre de nombreuses déterminations dans des conditions de conservation différentes. Une ampoule étant ouverte pour une titration cholinestérasique, les autres restaient intactes pour les déterminations ultérieures.

Nous avons aussi fait porter nos recherches sur des sérums commerciaux d'ancienneté connue, du moins approximativement (Hémostyl, Gravidostyl) ainsi que sur des sérums thérapeutiques anciens (antitétaniques, antidiphtériques) dont la date limite d'utilisation était depuis longtemps dépassée.

---

(1) Nous adressons nos très vifs remerciements à M. le Directeur des Laboratoires du Docteur Roussel, à Romainville, qui a eu l'extrême obligeance de nous permettre d'étudier des sérums provenant de leurs animaux ainsi qu'à M. le Docteur Refait, directeur technique, qui a bien voulu se charger des prélèvements et de la mise en ampoules.

ACTION DU VIEILLISSEMENT DU SERUM SUR L'ACTIVITÉ CHOLINESTERASIQUE

Voici tout d'abord des résultats donnant l'activité cholinestérasique de divers sérums très anciens.

	Activité cholinestérasique (cm^3 de NaOH 0,01 M en 20')
Sérum antitétanique de l'Institut Pasteur (périmé en 1943) dosage fait en Février 1946	1,10
Sérum antigangréneux Institut Pasteur (périmé en Novembre 1942).	
Dosage fait en Février 1946.....	2,90
Dosage fait en Mars 1948	1,85
Gravidostyl des laboratoires Roussel :	
récolté en 1939	2,45
récolté en 1944	2,90
récolté en 1945	3,30
dosages fait en Janvier 1947.	
Hémostyl:	
récolté en 1941	2,70
récolté en 1945	3,40
récolté en 1946	3,90
dosages faits en Février 1947.	

Nous avons étudié plusieurs sérums (d'animaux différents) dont nous connaissions l'ancienneté (sans antiseptiques ni tyndallisation).

Sérum N° 1
prélevé le 20 Janvier 1946
et conservé à la t° du laboratoire

Dosage après 3 jours	4 cc. 80
Dosage après 30 jours	4 cc. 40
Dosage après 64 jours	3 cc. 80
Dosage après 125 jours	3 cc. 65

Sérum N° 2

prélevé le 11 Février 1946
et conservé à la température du laboratoire

Dosage après 12 jours	5 cc. 10
Dosage après 73 jours	4 cc. 50
Dosage après 134 jours	4 cc. 30
Dosage après 286 jours	4 cc. 00
Dosage après 661 jours	3 cc. 65

Sérum N° 3

prélevé le 25 Février 1946
et conservé à la température du laboratoire

Dosage après 28 jours	4 cc. 40
Dosage après 89 jours	3 cc. 70
Dosage après 241 jours	3 cc. 00
Dosage après 616 jours	2 cc. 60

Sérum N° 4

prélevé le 4 Avril 1946
et conservé à la température du laboratoire

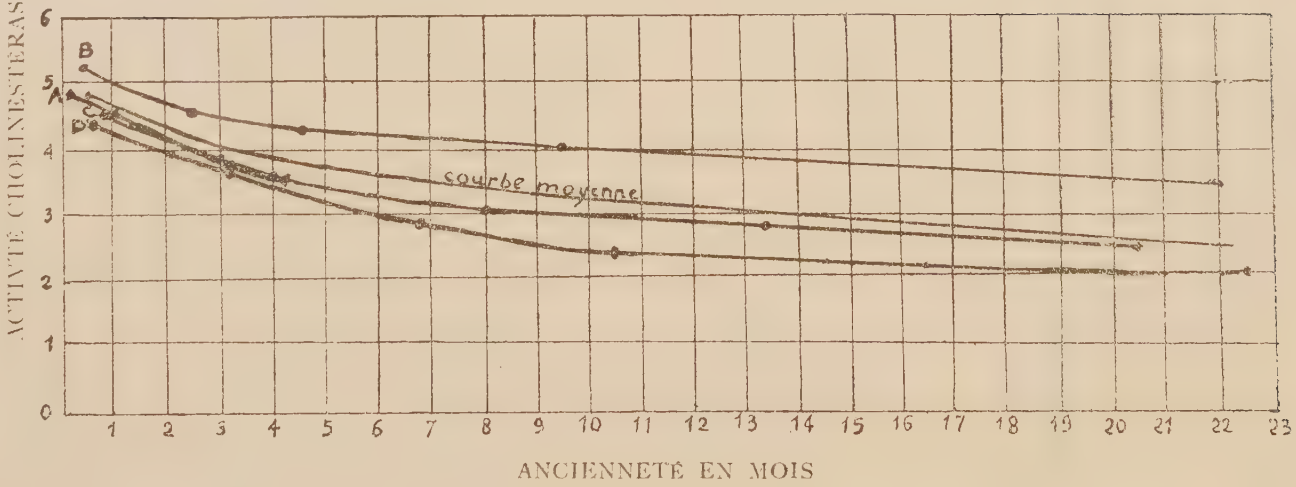
Dosage après 20 jours	4 cc. 35
Dosage après 95 jours	3 cc. 55
Dosage après 203 jours	2 cc. 90
Dosage après 314 jours	2 cc. 20
Dosage après 678 jours	2 cc. 00

Nous avons réuni tous ces résultats dans un graphique en portant l'ancienneté en abscisse et la valeur cholinestérasique en ordonnée.

Courbe A = sérum 1
Courbe B = sérum 2
Courbe C = sérum 3
Courbe D = sérum 4

GRAPHIQUE N° 1

Etude comparative des sérums N° 1, 2, 3 et 4, d'ancienneté variable, d'origine différente et conservés à la température du laboratoire sans antiseptiques ni tyndallisation.



Ainsi on voit qu'à la longue l'activité cholinestérasique du sérum de cheval diminue très progressivement. Rapide d'abord les premiers mois cette diminution de l'activité cholinestérasique tend ensuite à être moins nette.

Nous avons également constaté qu'au fur et à mesure que le sérum vieillissait il se faisait un dépôt plus ou moins volumineux. Nous précisons à ce propos qu'en présence d'un sérum semblable nous prenions la précaution de l'agiter soigneusement afin de mettre le dépôt en suspension. Ce dépôt est de nature protéïdique. Aussi avons-nous voulu voir si la diminution d'activité constatée ne proviendrait pas seulement d'une précipitation et d'une sédimentation de l'enzyme.

Essai sur un sérum vieux centrifugé 2,20

Essai sur le même sérum, non centrifugé, après agitation du dépôt 2,60

Ces résultats semblent confirmer que l'enzyme précipite tout au moins en partie dans le dépôt.

INFLUENCE DU MODE DE CONSERVATION DU SERUM SUR L'ACTIVITÉ CHOLINESTERASIQUE

Plusieurs séries d'essais ont été faites à ce point de vue : étude parallèle sur des sérums conservés à la température ordinaire ou à la glacière, additionnés ou non d'antiseptiques, enfin étude d'un sérum conservé à l'état sec.

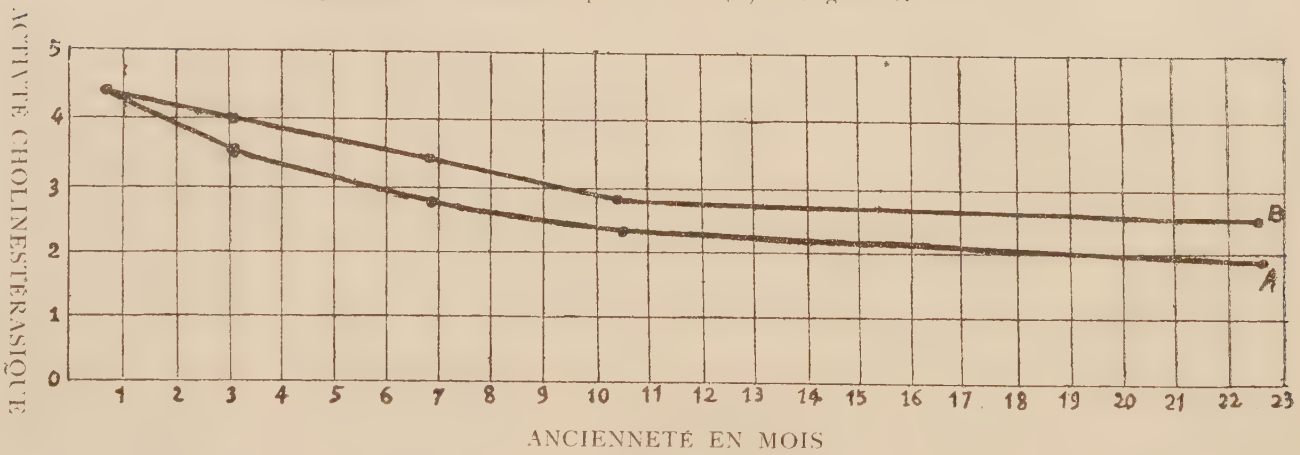
a) *Comparaison des résultats obtenus sur des sérums conservés à la température ordinaire ou à la glacière.*

Sérum N° 5
(du même animal que le N° 4)
prélevé le 4 Avril 1946 et conservé à la glacière

Dosage après 20 jours	4 cc. 35
Dosage après 95 jours	4 cc. 00
Dosage après 203 jours	3 cc. 50
Dosage après 314 jours	2 cc. 90
Dosage après 678 jours	2 cc. 60

GRAPHIQUE N° 2

Etude comparative des sérums N° 4 et 5 de même ancienneté, de même origine mais dont la conservation a été faite pour l'un (A) à la température du laboratoire, pour l'autre (B) à la glacière.



b) *Comparaison des résultats obtenus sur des sérums tyndallisés ou non additionnés d'antiseptique ou non.*

L'antiseptique utilisé fut le « Quinosol » à la concentration de 0,1 pour 1.000 dans le sérum.

Sérum N° 6

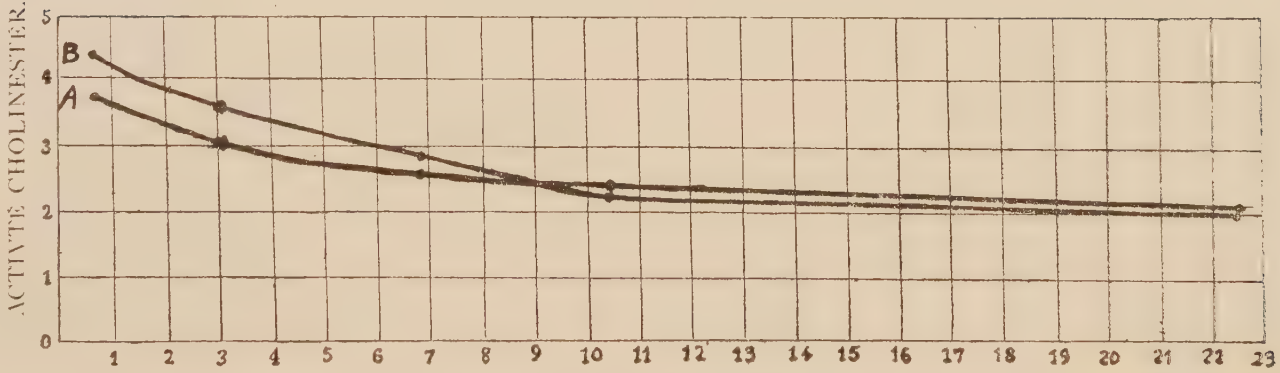
(provenant du même animal que le N° 4)

prélevé le 4 Avril 1946
et conservé à la température du laboratoire.
Sérum tyndallisé à 51°, 2 fois à 48 heures d'intervalle
et additionné de Quinosol.

Dosage après 20 jours	3 cc. 70
Dosage après 95 jours	3 cc. 00
Dosage après 203 jours	2 cc. 60
Dosage après 314 jours	2 cc. 30
Dosage après 678 jours	2 cc. 05

GRAPHIQUE N° 3

Etude comparative des sérums N° 4 et 6 de même ancienneté, de même origine mais dont l'un (A) a été tyndallisé et additionné de Quinosol alors que l'autre (B) n'a subi aucun traitement.

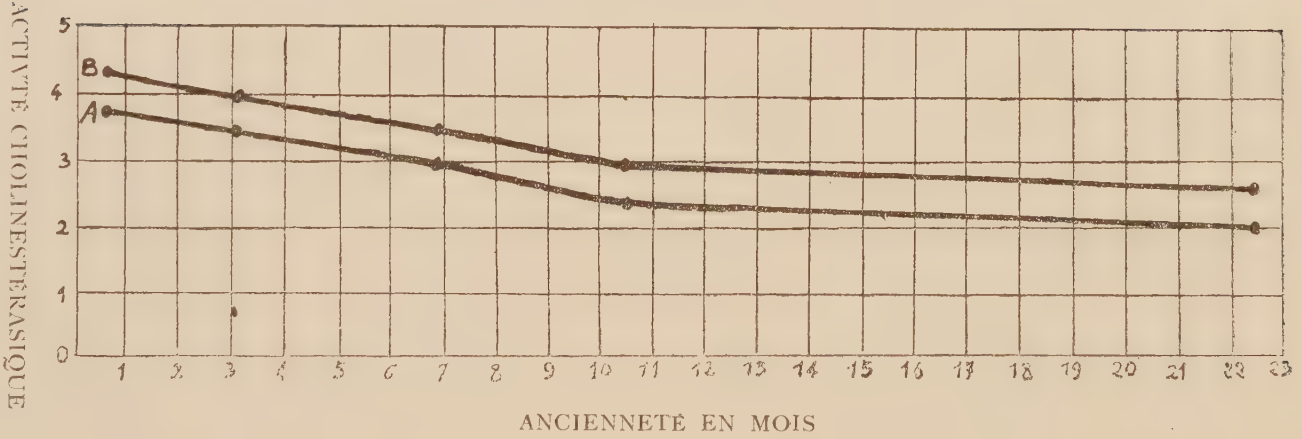


Sérum N° 7
prélevé le 4 Avril 1946 et conservé à la glacière.
Sérum tyndallisé à 51° 2 fois à 48 heures d'intervalle
et additionné de Quinosol à 0,1 pour mille.

Dosage après 20 jours	3 cc. 70
Dosage après 95 jours	3 cc. 35
Dosage après 203 jours	2 cc. 90
Dosage après 314 jours	2 cc. 30
Dosage après 678 jours	2 cc. 00

GRAPHIQUE N° 4

Etude comparative des sérums 5 et 7 de même ancienneté, de même origine, tous deux conservés à la glacière mais dont l'un (A) a été tyndallisé et additionné de Quinosol alors que l'autre (B) ne l'a pas été.



ETUDE COMPARATIVE DE 5 SERIES D'ECHANTILLONS PRELEVÉS SUR UN MEME CHEVAL A DES PERIODES DIFFERENTES, TYNDALLISÉS ET ADDITIONNÉS DE « QUINOSOL » TITRÉS EN FONCTION DU VIEILLISSEMENT.

Sérum N° 8

prélevé le 3 Décembre 1945

et conservé à la température du laboratoire.

Dosage après 51 jours	3 cc. 80
Dosage après 112 jours	3 cc. 60
Dosage après 325 jours	2 cc. 90
Dosage après 424 jours	2 cc. 70

Sérum N° 9

prélevé le 26 Octobre 1945

et conservé à la température du laboratoire.

Dosage après 89 jours	3 cc. 60
Dosage après 150 jours	3 cc. 30
Dosage après 211 jours	3 cc. 15
Dosage après 363 jours	2 cc. 80
Dosage après 462 jours	2 cc. 55

Sérum N° 10

prélevé le 7 Septembre 1945

et conservé à la température du laboratoire.

Dosage après 138 jours	3 cc. 20
Dosage après 199 jours	3 cc. 00
Dosage après 260 jours	2 cc. 80
Dosage après 412 jours	2 cc. 55
Dosage après 511 jours	2 cc. 40

Sérum N° 11

prélevé le 3 Août 1945

et conservé à la température du laboratoire.

Dosage après 173 jours	3 cc. 20
Dosage après 234 jours	3 cc. 10
Dosage après 295 jours	2 cc. 90
Dosage après 447 jours	2 cc. 60
Dosage après 546 jours	2 cc. 30

Sérum N° 12

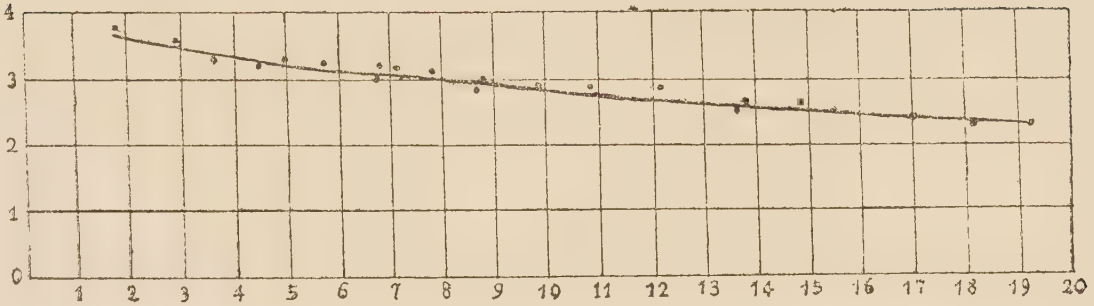
prélevé le 6 Juillet 1945

et conservé à la température du laboratoire.

Dosage après 201 jours	3 cc. 10
Dosage après 262 jours	3 cc. 00
Dosage après 323 jours	2 cc. 90
Dosage après 475 jours	2 cc. 50
Dosage après 574 jours	2 cc. 30

GRAPHIQUE N° 5

Courbe moyenne obtenue en faisant l'étude comparative de 5 sérums prélevés sur un même cheval, à des périodes différentes, tyndallisés et additionnés de « Quinosol ».



On peut remarquer que, malgré l'addition d'antiseptique et la tyndallisation préalable la baisse de l'activité cholinestérasique en fonction du vieillissement se poursuit. Ceci prouve que ce phénomène n'est pas lié à une action de cause microbienne mais est probablement dû seulement à un processus d'autolyse protéolytique spontané.

On observe une diminution d'activité cholinestérasique initiale des sérums additionnés de « Quinosol ». La raison de ce fait est évidemment à rattacher à un certain pouvoir inhibiteur de ce composé. En effet on a signalé l'action inhibitrice de certains dérivés de la quinoléïne sur la cholinestérase et en particulier des alcaloïdes du quinquina (D. Vincent et P. Beaujard) (56). Voici un aperçu de l'activité anticholinestérasique signalée par ces auteurs de ces alcaloïdes sur le sérum de cheval en fonction de la concentration alcaloïdique :

Alcaloïdes	Concentration en alcaloïdes			
	10^{-4} inhibition obtenue	10^{-5} inhibition obtenue	10^{-6} inhibition obtenue	10^{-7} inhibition obtenue
Quinine	63-70 %	55-60 %	10-20 %	0
Quinidine	71-77 %	60-65 %	27-33 %	8-15 %
Cinchonine	55-65 %	45-50	18-24 %	0 %
Cinchonidine	58-65 %	30-40 %	10-20	0 %

Des recherches récentes de SCHEINER (1946) ont montré d'autre part l'effet inhibiteur cholinestérasique de la naphtylquinoléïne, de la quinoléïne et de l'oxyquinoléïne qui sensibiliserait le muscle de sangsue à l'acétylcholine. L'iodométhylate de β naphtylquinoléïne a un effet anticholinestérasique très puissant.

Nous avons jugé intéressant de faire un essai de l'action inhibitrice de l'oxyquinoléïne (sulfate) (quinosol) sur la cholinestérase du sérum de cheval. Les résultats obtenus en fonction de la concentration en sont consignés dans le tableau suivant :

Action inhibitrice du « Quinosol » sur la cholinestérase du sérum de cheval

Concentration en Quinosol dans le milieu	10^{-3}	2.10^{-4}	10^{-4}	$0{,}5.10^{-4}$	10^{-5}
Valeur de l'inhibition obtenue	48 %	14 %	10 %	6 %	5

ÉTUDE DU SÉRUM DESSÉCHÉ

Le sérum desséché est actuellement une forme nouvelle particulièrement intéressante dans l'emploi thérapeutique des sérums, se justifiant surtout par une grande sécurité de conservation. Aussi avons nous voulu étudier, au moins d'une façon sommaire sur quelques échantillons de sérum sec le comportement de la cholinestérase, en comparaison avec ce que nous avons pu observer à propos du sérum ordinaire de cheval

Nous avons fait porter cette étude sur un échantillon de sérum de cheval desséché à —10° dans le vide moléculaire en Juin 1946, échantillon qui nous a été très obligeamment fourni par les laboratoires du Docteur ROUSSEL. Pour la titration de l'activité cholinestérasique nous avons mis en solution 0 gr. 100 de produit sec dans 1 cc. d'eau distillée, afin d'avoir une concentration semblable à ce qu'on trouve dans le sérum normal.

La solution obtenue facilement après une agitation modérée était ajoutée à la solution acétylcholinique, comme dans la technique habituelle de dosage de la cholinestérase. Deux mesures ont été faites, échelonnées à près d'un an d'intervalle. Nous en apportons ci-dessous les résultats.

	Activité cholinestérasique
Sérum I desséché en Juin 1946 ; titré le 20 Fév. 1947	3,9
Sérum II desséché en Juin 1946 ; titré le 25 Nov. 1947	2,8
Sérum III desséché en Nov. 1947 ; titré le 25 Nov. 1947	6,0
Sérum IV desséché en Juin 1946 ; titré le 22 Mars 1948 (même origine que I).	3,8

Au cours de ces recherches nous avons pu remarquer qu'un sérum sec pulvérisé pour un premier dosage et abandonné ensuite quelques mois à l'air libre avait au bout de ce temps une activité cholinestérasique diminuée. De plus la poudre ne se dissout qu'incomplètement.

Dans un autre cas où le sérum fut conservé dans un flacon bouché et à la température ordinaire il n'y a pas eu de perte

d'activité cholinestérasique et la poudre a gardé son aspect initial.

Il semble donc, sous réserve de recherches plus approfondies, que le sérum desséché soit la forme la meilleure pour conserver intactes les qualités fermentaires du sérum original.

CONCLUSIONS

Nous apportons dans ce travail nos résultats de recherches d'ordre pratique concernant l'utilisation du dosage de la cholinestérase du sérum dans un double but :

1°) pour l'identification du sérum de cheval utilisé comme médicament et servir à son essai.

2°) pour en étudier le vieillissement.

La technique utilisée a été la méthode alcalimétrique, d'après les données de STEDMAN et WHITE, adaptée sous forme de titration discontinue par VINCENT, SEGONZAC et Mlle de PRAT.

La présence d'une cholinestérase très active dans le sérum de cheval, son absence pratiquement complète dans le sérum de bovidés sont deux faits qui permettent une différenciation facile des sérums de ces deux origines. Nous donnons une méthode simple de diagnose du sérum de cheval basée sur ce principe, avec une technique simplifiée ne comportant aucune titration véritable mais basée seulement sur le virage du rouge de crésol indicateur de pH dans certaines conditions bien définies. Cette méthode facile à mettre en œuvre est applicable à l'officine et peut servir à la diagnose rapide du sérum de cheval.

Nous avons d'autre part suivi l'activité cholinestérasique du sérum de cheval sur de nombreux échantillons en fonction de leur ancienneté.

On constate une baisse lente et progressive de cette activité. Toutefois même sur les sérums les plus anciens tels des échantillons de sérums thérapeutiques périmés depuis longtemps,

il persiste une activité cholinestérasique encore considérable bien que fortement diminuée. La chute cholinestérasique est d'abord relativement rapide au cours de la première année de conservation où elle peut atteindre 30% ou même davantage puis, tout en continuant à baisser lentement, elle tend à une stabilisation relative.

Nous avons ainsi suivi des sérums pendant plus de deux ans par de nombreux dosages faits dans diverses conditions. Nous avons constaté ainsi :

que la perte d'activité cholinestérasique est moins rapide si le sérum est conservé à la glacière au lieu d'être gardé à la température ordinaire.

que l'addition de « Quinosol » à la concentration de 0,1 pour 1.000 dans le sérum provoque une légère perte initiale d'activité, mais que la courbe cholinestérasique en fonction du vieillissement baisse un peu plus lentement. Enfin quelques essais ont été faits sur des échantillons de sérum desséché à basse température sous vide par les procédés industriels modernes. Dans ces conditions le sérum garde une forte activité cholinestérasique qui fait présumer, sous réserve de recherches plus nombreuses que le sérum desséché représente la forme la meilleure pour la conservation des propriétés fermentaires des sérums.

Ainsi l'étude de la titration de la cholinestérase du sérum permet des applications utiles qui certainement sont susceptibles de rendre des services dans la pratique courante officinale et même dans l'industrie pharmaceutique.

Vu :
Le Président de la thèse,
D. VINCENT.

Vu :
Le Doyen,
J. CALVET.

Vu et permis d'imprimer :
Toulouse, le 18 Mai 1948.
Le Recteur, Président du Conseil de l'Université,
P. DOTTIN.

..QUESTIONS POSÉES PAR LA FACULTÉ

1° *La toxicologie des sulfamides.*

2° *Les Haptènes.*

BIBLIOGRAPHIE

1. Abdon (N.-O.) and B. Uvnas. — *Scand. Arch. Physiol.* 1937, *1*, 76.
2. Ammon (R.) und Voss (G.). — *Arch. ges. Physiol.* 1935, *393*, 235.
3. Augustinsson (K.). — Cholinesterase and its specificity. *Nature*, 1946, *175*, 587.
4. Augustinsson (K.) — Cholinestérases. *Actaphysiol. scand.* 1948, *15*, suppl. 52.
5. Bacq (Z. M.) — Nouvelles observations sur l'acétylcholine et la cholinestérase chez les invertébrés. *Arch. Intern. Physiol.*, 1937, *44*, 174.
6. Bacq (Z. M.) and Brown (G. L.) — Pharmacological experiments on mammalian volontary muscle in relation to the theory of chemical transmission. *Journ. of. Physiol.*, 1935, *84*, 259.
7. Beaujard (P.). — Recherches sur les alcaloïdes inhibiteurs de la cholinestérase. *Thèse Pharmacie Toulouse*, 1944.
8. Bernheim (F.) and Bernheim (M.). — Action of drugs ont the cholinesterase of the brain. *Journ. of. Pharm.*, 1936, *122*, 1128.
9. Caujolle (F.)., Vincent (D.) et Franck (C). — Action anticholinestérasique des essences végétales. *Comm. Soc. Ph. Toulouse*, Février 1944.
10. Chang (H. C.) and Gaddum (J. H.). — Choline esters in tissues extracts. *Journ. of. Physiol.*, 1933, 79, 255.
11. Dale (H. H.). — The action of certains esters et ethers of choline and their relation to muscarine. *Journ. of. Phar.*, 1914, *6*, 147.

12. Danielopolu (D.). — La pathologie de la maladie du sérum des infections et d'autres maladies spécifiques. *Presse Médicale*, 22 Avril 1944, *52*, 114.

13. Dastugue (G.). — Etudes critiques et expérimentales du dosage de l'acétylcholine par les méthodes biologiques. *Thèse Doctorat Sciences*. Lyon, 1940.

14. Delage (B.). — *Bull. Soc. Chimie biol.* 1936, *18*, 1304.

15. Desbordes (J.). — Le test du vieillissement artificiel de sérum. *Annales Biol. Clinique*, 1943, *1*, 167.

16. Dhellemmes (G.). — Recherches sur la pseudocholinestérase du sérum humain. *Thèse Pharm. Lille*, 1947.

17. Easson and Stedman. — The specifity of cholinesterase. *Bioch. Journ.*, 1937, *31*, 1723.

18. Faber, Mogens. — Sérum cholinestérase in disease. *Acta medica Scandinavia*, 1943, *114*, 60.

19. Froment et Kaswin. — Augmentation de l'activité cholinestérasique du sérum dans les polynévrites chez l'homme. *Soc. Méd. Hôp. Paris, in Presse Médicale*, 1945.

20. Führer (H.). — Die quantitative Bestimmung des cholins auf biologischen wege. *Bioch. Ztsch.*, 1916, *77*, 408.

21. Glasson (B.). — *Schweiz méd. Wosch.*, 1945, *75*, 1011.

22. Gunther (J.). — *Nature*, 1946, *157*, 395.

23. Halpern (N.) et Corteggiani (E.). — Etude comparative de la destruction de l'acétylcholine par divers organes de cobaye, grenouille, escargot. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, *119*, 1049.

24. Hall (G. E.) and Lucas (C. C.) — *Jour. Ph. exp. Physiol.*, 1937, *27*, 41.

25. Heim (F.) et Fahr (A.). — *Arch. exper. Path. pharm.*, 1940, *195*, 59.

26. Jellineck (M. E.) and Looney. — *Jour. Biol. chem.*, 1939, *621*, 128.

27. Kahane (E.) et Levy (J.). — Caractérisation et dosage de l'acétylcholine dans les substances biologiques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1936, *18*, 505.

28. Kahane et Levy. — Influences de quelques agents antiestérasiques sur l'activité pharmacodynamique de l'acétylcholine. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, *125*, 252.

29. Kahn et Surles. — *Arch. Internat. Pharm.*, 1938, *58*, 88.

30. Kochtojanz. — Content of acetylcholine-like substances in the nerve tissue and of cholinestérase in the hemolymph of crustaceans. *Bulletin Biol. et Med. exper.*, 1938, vol. 5, n° 4.

31. Lapicque (L.). — Nouvelle hypothèse sur le rôle de l'acétylcholine dans la transmission de l'excitation nerveuse au muscle strié. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, *122*, 990.

32. Laurent (R.). — Contribution à l'étude pharmacologique du buis. Action sur la cholinestérase. *Thèse Pharmacie Toulouse*, 1947.

33. Leulier (A.) et Revol (L.). — Soc. de Pharmacie Lyon, 30-6-44. *Annales pharm. fr.*, 1944, *2*, 182.

34. Lœwi (C.). — Ueber humorale Uebertragbarkeit der Herznervenwirkung. *Arch. f. Physiol.*, 1921, *189*, 239; 1922, *193*, 201.

35. Lœwi und Navratil (E.). — Ueber den mechanismus der Vaguswirkung von Physostigmin und Ergotamin. *Arch. f. Physiol.*, 1926, *214*, 689.

36. Marnay et Nachmansohn (D.). — Action des substances sympathicomimétiques et parasympathicomimétiques sur les processus chimiques fournissant l'énergie de la contracture musculaire. II. Action de l'acétylcholine. *Bull. Soc. Chim.*, 1937, *19*, 445.

37. Marnay et Nachmansohn. — Cholinestérase dans le muscle strié. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, *124*, 942.

39. Massart et Dufait. — Activation et inhibition de la cholinestérase. *Enzymologia*, 1939, *6*, 282.

40. Matthes (K.). — The action of blood on acetylcholine. *Journ. of physiol.*, 1930, *70*, 338.

41. Maugein (A.). — Dosage biochimique de l'ésérine. *Thèse Pharmacie Toulouse*, 1943.

42. Mendel (B.), Mundell and Strelitz. — *Nature* (Brit.)., 1939, *144*, 479.

43. Mendell (B.), and Mundell (D.). — Cholinestérase and pseudocholinestérase. *Biochimical Journal*, 1943, *37*, 59.

44. Mendel (B.), Mundell and Rudney. — Specific test for trae cholinestérase and pseudo-cholinestérase. *Nature*, 1943, *37*, 473.

45. Minz (B.). — Pharmakologische Untersuchungen am Blutegelpräparat. Zugleich eine Methode zum biogischen Nach-

weiss von Acetylcholin bei Anwesenheit anderer pharmacologisch. Wirksamer Korpereigener stoffe. *Arch. f. exper. path.*, 1932, *168*, 292.

46. Nachmansohn (D.) et Lederer. — Sur la biochimie de la cholinestérase. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1939, *27*, 797.

47. Paget (M.). — Questionnaire du praticien. *Annales de Biol. Clin.*, 1947, *5*, 431.

48. Roche (A.) et Bracco (J.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1934, *16*, 1479.

49. Roche (J.), Olmer et Samuel (L.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1937, *125*, 154.

50. Roche (J.), Olmer et Samuel (L.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1939, *21*, 1264.

51. Plattner (F.) und Hintner. — Die Spaltung von Acetylcholin durch organextrakte und Korperflüssingkeiten. *Arch. F. Physiol.*, 1930, *225*, 19.

52. Schweitzer (A.) and Wright (S.). — The action of eserine and related compounds of acetylcholine on the central nervous system. *Jour. of. Physiol.*, 1937, *89*, 165.

53. Scoz and Cattaneo (C.). — Determinazione del potere colin esterasio del sangue per via electrometrica. *Enzymologia*, 1937, *4*, 157.

54. Stedman (E.) and White. — Comparaison of the cholinestérase activitie of the blood sera from various species. *Bioch. Jour.*, 1933, *27*, 1055.

55. Vahlquist (B.). — *Scand. Arch. Physiol.*, 1935, *72*, 133.

56. Vincent (D.) et Beaujard (P.). — Recherches sur les inhibiteurs de la cholinestérase. *Bull. Soc. Chimie Biol.* (Travaux de membres), 1943, *25*, 1358.

57. Vincent (D.) et Broca (J.). — Méthode de diagnose du sérum de cheval par titration cholinestérasique. *Annales pharmaceutiques Franç.*, 1946, *4*, 187.

58. Vincent (D.) et Sero (I.). — Recherches biochimiques et pharmacodynamiques sur Tabernante Iboga Baillon. *Bull. Soc. Chim. Biol.* (Travaux des membres), 1942, *24*, 1352.

59. Vincent (D.) et Maugein (A.). — Dosage biochimique de l'ésérine par mesure de son action anticholinestérasique (application en matière médicale et pharmacie). *Bull. Sciences Pharm.*, 1942, *49*, 141.

60. Vincent et Mathou (Th.). — Action inhibitrice du buis sur la cholinestérase du sérum. *Acad. des Sciences*, 19 Fév. 1945.

61. Vincent et Brygoo (P.). — La cholinestérase du sérum dans la syphilis. *Soc. de Méd. et Chir. et Pharm. de Toulouse*, 20 Fév. 1945.

62. Vincent et Jullien (A.). — Contribution à l'étude de la cholinestérase chez les invertébrés. La cholinestérase de l'hémolymphe des mollusques. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, *127*, 628.

63. Vincent et Malbec (6.). — Effet du calcium en injection intraveineuse sur la cholinestérase du sérum chez l'homme. *Soc. de Méd. et Chir. et Pharm. de Toulouse*, 21 Mai 1946.

64. Vincent et Brygoo (P.). — Sur l'activité cholinestérasique du sérum. Etude de ses modifications en fonction de la conservation durant les 10 premiers jours après le prélèvement. *Anna Biol. clinique*, 1945, *3*, 33.

65. Vincent, Segonzac (G.), De Prat (J.). — La cholinestérase du sérum, son dosage. Intérêt clinique de son étude. *Ann. Biol. clinique*, 1934, *2*, 35.

66. Vincent, Segonzac, De Prat, Brygoo. — Sur la pathogénie de la tétanie. *Sté de Méd. de Toulouse*, 2-4-1944.

67. Wense. — *Fermentforsch*, 1937, *15*, 291.

68. Zeller (E.) und Bisseger (A.). — Ueber die cholinestérase des gehirns und der Erythrocyten. *Helvetica chim. acta*, 1943, *26*, 1619

MP FORESTIÉ MONTAUBAN